

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Sección Departamental de Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

**Aplicación de técnicas de resonancia magnética nuclear al
estudio de miosistemas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Andrés García Álvarez

Directores

M^a Isabel Cambero Rodríguez
M^a Encarnación Fernández Valle
David Castejón Ferrer

Madrid
Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR AL ESTUDIO DE MIOSISTEMAS

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Belén García García

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES

M^a Isabel Cambero Rodríguez

M^a Encarnación Fernández Valle

David Castejón Ferrer

Madrid, 2018



M^a ISABEL CAMBERO RODRÍGUEZ, Profesora Titular de la Sección Departamental de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, M^a ENCARNACIÓN FERNANDEZ VALLE y DAVID CASTEJÓN FERRER, ambos Técnicos de Grado Superior de la Unidad de Resonancia Magnética (CAI de Bioimagen Complutense) de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Aplicación de técnicas de Resonancia Magnética Nuclear al estudio de miosistemas”**, ha sido realizada bajo su dirección por Ana Belén García García en la Sección Departamental de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Asimismo, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente para optar al grado de Doctor.

Madrid, 09 de julio de 2018

Los directores de la Tesis Doctoral

Fdo.: M^a Isabel Cambero Rodríguez

Fdo.: M^a Encarnación Fernández Valle

Fdo.: David Castejón Ferrer

El trabajo experimental realizado durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral ha sido financiado mediante el proyecto de investigación **AGL2010-19158**: *"Ensayos de tensión y adhesión en productos de origen animal. Aplicación a la mejora del envasado de productos loncheados"* del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. La doctoranda disfrutó de una beca predoctoral F.P.I. (Referencia: BES-2011-047485) otorgada por el mismo organismo. El trabajo realizado se enmarca dentro de las líneas de investigación desarrolladas por el Grupo UCM-BSCH Nº 920276 Ref. GR3/14.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos años, muchas son las personas que han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores M^a Isabel Cambero, M^a Encarnación Fernández y David Castejón su apoyo y dedicación durante este periodo. Gracias Isabel por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de comenzar esta Tesis, por tu esfuerzo constante y tu amor al trabajo. Marién y David, gracias por iniciarme en la RMN, por vuestro apoyo, orientación y buenos consejos.

En segundo lugar, mi agradecimiento a los técnicos que han contribuido a la realización de la parte experimental, especialmente a Palmira Villa, técnica del CAI de RMN de la UCM y a los trabajadores del Centro Nacional de Microscopía.

También me gustaría agradecer a mi supervisora en Dinamarca, Hanne Christine Bertram, el haberme dado la oportunidad de colaborar con su grupo, su buena acogida y su presencia en la distancia.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, Rosa, Lola y Carlos por los buenos momentos y a mi amiga Karen que vivió conmigo esta experiencia desde el primer día y con la que he compartido mucho más que trabajo.

Quiero agradecer al personal laboral, en especial a Santiago y Andrés, su cercanía, amabilidad y disposición para ayudar.

Gracias a mis padres, Carmen y Rafa, por el apoyo y cariño que manifestáis día a día, por haber dedicado todo vuestro esfuerzo a la educación de vuestros hijos, por haber confiado en mí y haberme dado siempre libertad para elegir mi camino.

A Rubén, gracias por tu optimismo, por tu labor de *coach*, por recordarme que sí se puede y por estar siempre a mi lado.

Gracias a Leo, por llenar mi vida de buenos momentos.

A mis padres

A Rubén, a Leo

Resumen / Abstract	1
I. Introducción	15
I.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)	19
I.1.1. Contexto histórico	19
I.1.2. Fundamento de la técnica	21
I.1.3. Metodologías de RMN en análisis de alimentos	26
I.1.3.1. Imagen de Resonancia Magnética (IRM)	27
I.1.3.2. Relaxometría	30
I.1.3.3. Espectroscopía de RMN	32
I.1.3.3.1. Análisis de muestras mediante ^1H RMN.....	36
I.1.3.3.2. Análisis metabolómico	40
I.1.3.3.3. Procesado y análisis de los datos espectrales.....	43
I.2. El sector cárnico español.....	48
I.2.1. Situación actual de la industria cárnica española	48
I.2.2. Importancia económica de la carne de cerdo y sus derivados cárnicos	50
I.3. El cerdo.....	53
I.3.1. Consideraciones generales.....	53
I.3.2. Estructura y composición de la carne de cerdo	54
I.3.3. Estructura del tejido muscular	55
I.3.4. Composición del músculo porcino	57
I.3.4.1. Agua.....	57
I.3.4.1.1. Exudado acuoso cárnico.....	61
I.3.4.2. Proteínas	62
I.3.4.3. Lípidos	63
I.3.4.4. Carbohidratos.....	64
I.3.5. Aspectos nutricionales de la carne de cerdo	65
I.4. Derivados cárnicos	69
I.4.1. Generalidades	69
I.4.2. Definición de derivados cárnicos	71
I.4.3. Jamón curado	72
I.4.3.1. Definición	72
I.4.3.2. Tipos de jamones curados en España	72
I.4.3.3. Proceso de elaboración	73
I.4.3.3.1. Selección del pernil	74
I.4.3.3.2. Preparación y acondicionamiento de la materia prima	74
I.4.3.3.3. Salado	74

I.4.3.3.4. Reposo o post-salado	75
I.4.3.3.5. Secado-maduración	75
I.4.4. Embutidos cárnicos	76
I.4.4.1. Definición	76
I.4.4.2. Tipos de chorizos y salchichones.....	76
I.4.4.3. Proceso de elaboración	77
I.4.4.3.1. Picado de la carne y la grasa	78
I.4.4.3.2. Mezclado con el resto de ingredientes y aditivos.....	78
I.4.4.3.2.1. Sal común	78
I.4.4.3.2.1.1. Efecto de la sal en la CRA	79
I.4.4.3.2.1.2. Difusión	80
I.4.4.3.2.2. Nitratos y nitritos	80
I.4.4.3.2.3. Azúcares	81
I.4.4.3.2.4. Ascorbato	82
I.4.4.3.2.5. Especias	82
I.4.4.3.2.6. Cultivos iniciadores	82
I.4.4.3.3. Embutido	83
I.4.4.3.4. Fermentación	84
I.4.4.3.5. Curado	85
I.4.5. Evolución de los productos cárnicos curados durante la etapa de secado-maduración.....	86
I.4.5.1. Parámetros fisicoquímicos	86
I.4.5.1.1. Humedad y actividad de agua	86
I.4.5.1.2. Desarrollo del color	87
I.4.5.2. Fracción proteica.....	89
I.4.5.2.1. Evolución de las fracciones nitrogenadas	89
I.4.5.2.2. Proteólisis.....	90
I.4.5.3. Fracción lipídica.....	93
I.4.5.3.1. Lipólisis	93
I.4.5.3.2. Oxidación lipídica	94
II. Objetivos	99
III. Material y métodos	105
III.1. Materiales de laboratorio	109
III.1.1. Reactivos y disolventes	109
III.1.2. Material instrumental	109
III.2. Material cárnico	111
III.2.1. Perniles y jamones en distintas etapas de curado	111

III.2.2. Modelos cárnicos y embutidos crudos curados	112
III.2.3. Exudados cárnicos	116
III.3. Metodología	118
III.4. Determinación de parámetros fisicoquímicos	119
III.4.1. Determinación de la actividad de agua	119
III.4.2. Determinación del pH	119
III.4.3. Determinación del contenido acuoso	119
III.4.4. Determinación del contenido en cenizas	120
III.4.5. Determinación del contenido en grasa	120
III.4.6. Determinación del contenido en proteína	121
III.5. Determinación de las propiedades de textura	122
III.5.1. Análisis del perfil de textura	122
III.5.2. Ensayo de tracción uniaxial destructivo	124
III.6. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	126
III.7. Ensayo con fluorescamina	128
III.8. Electroforesis SDS-page	129
III.9. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	130
III.9.1. Imagen de Resonancia Magnética (IRM) y relaxometría T ₂ de alto campo	130
III.9.2. Relaxometría de bajo campo (Low-field Nuclear Magnetic Resonance, LF-NMR)	132
III.9.3. Espectroscopía de RMN de alta resolución	133
IV. Resultados	135
IV.1. Estudio de la estructura (macro y micro) de distintos productos cárnicos curado	137
IV.1.1. Trabajo 1. Empleo de la IRM como herramienta predictiva para estimar parámetros fisicoquímicos y reológicos durante el proceso de elaboración de jamón curado	139
IV.1.2. Trabajo 2. Estudio comparado de la microestructura de jamón curado mediante relaxometría T ₂ de RMN, microscopía electrónica de barrido (MEB) y ensayos de tracción uniaxial	167
IV.1.3. Trabajo 3. Estudio del proceso de proteólisis durante la maduración de modelos cárnicos elaborados a base de carne picada	185
IV.1.4. Trabajo 4. Distribución y movilidad de agua durante el proceso de elaboración de embutidos crudos curados y su relación con características fisicoquímicas y reológicas	197
IV.2. Análisis de la composición de derivados cárnicos y exudados cárnicos mediante espectroscopía de ¹ H RMN de alta resolución	213
IV.2.5. Trabajo 5. Monitorización del proceso de elaboración de jamón curado mediante espectroscopía de RMN de alta resolución	215
IV.2.6. Trabajo 6. Identificación de los principales metabolitos presentes en embutidos crudos curados y evolución de los mismos durante el proceso de maduración	233

IV.2.7. Trabajo 7. Valoración de los exudados de cerdo como matriz apta para la monitorización de la conservación de la carne tratada con electrones acelerados.....	247
V. Discusión integradora	269
V.1. Análisis de la estructura de derivados cárnicos	273
V.1.1. Aplicación de la IRM al estudio de la macroestructura de jamón curado	273
V.1.2. Aplicación de la relaxometría T_2 de RMN al estudio microestructural de distintas matrices cárnicas.....	276
V.1.2.1. Modificaciones derivadas del curado de piezas cárnicas enteras versus matrices cárnicas picadas	279
V.1.2.2. Efecto de la adición de proteasas	283
V.1.3. RMN y características fisicoquímicas de derivados cárnicos	285
V.1.4. RMN y comportamiento reológico de derivados cárnicos	287
V.2. Análisis metabólico de derivados cárnicos y exudados.....	292
V.2.1. Derivados cárnicos	292
V.2.2. Exudados cárnicos.....	297
VI. Conclusiones / Conclusion	305
VII. Bibliografía	311
VIII. Índice de abreviaturas	323

Resumen / Abstract

INTRODUCCIÓN

Las técnicas basadas en el principio de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) son herramientas de análisis no destructivo que aportan valiosa información sobre las matrices cárnicas, tanto a nivel estructural como a nivel bioquímico. Por un lado, se ha estudiado el potencial la Imagen de Resonancia Magnética (IRM) para estudiar la macroestructura de piezas musculares. Por otro lado, se ha evaluado la aptitud de la relaxometría de RMN para el estudio y caracterización de la microestructura de miosistemas cárnicos y, finalmente, se ha comprobado el potencial de la espectroscopía de alta resolución de RMN para el estudio del perfil metabólico de muestras de músculo íntegras y muestras de exudado. Estas metodologías permiten el análisis de matrices complejas de forma rápida, sin apenas preparación de la muestra y su carácter no invasivo y no destructivo aumenta su ámbito de aplicación.

PLANTEAMIENTO

Se ha empleado la RMN para el estudio de distintos miosistemas cárnicos. Por un lado, se ha analizado un derivado cárnico elaborado a partir de una pieza entera, el jamón curado. Por otro lado, se elaboraron distintos productos a partir de carne picada: modelos cárnicos y embutidos crudos curados, tipo chorizo y tipo salchichón. Se planteó un estudio longitudinal para monitorizar el proceso de maduración de estos productos, realizando un seguimiento de los cambios estructurales (mediante IRM y relaxometría de RMN) y bioquímicos (mediante espectroscopía de RMN) experimentados por la matriz cárnica durante del tiempo de curado. Además, se empleó la espectroscopía de RMN para el análisis de matrices líquidas procedentes de miosistemas cárnicos (exudados) y evaluar su potencial como matriz para monitorizar el proceso de conservación de la carne de cerdo.

OBJETIVOS

Se han abordado dos objetivos generales:

- Evaluar el potencial de las técnicas no destructivas de RMN (IRM y relaxometría de RMN) para monitorizar el proceso de maduración de distintos derivados cárnicos (jamón curado, modelos cárnicos y embutidos crudos curados) a través de los cambios macro y microestructurales experimentados por los citados miosistemas durante su elaboración.

- Valorar la aptitud de la espectroscopía de alta resolución de RMN para monitorizar distintos procesos de la industria alimentaria en base a muestras musculares íntegras, incluyendo maduración y/o curado y conservación, y muestras de naturaleza líquida (exudados).

RESULTADOS

Se han desarrollado varias etapas en las que se han afrontado distintos objetivos parciales, como seguidamente se indica. Los resultados obtenidos han dado lugar a siete artículos incluidos en esta memoria.

Trabajo 1. Empleo de la IRM como herramienta predictiva para la estimación de parámetros fisicoquímicos y reológicos durante el proceso de elaboración de jamón curado.

En este trabajo se describe el uso de la IRM como herramienta predictiva para el cálculo de características fisicoquímicas y parámetros de textura. Esta técnica permitió la monitorización del proceso de elaboración del producto, revelando las principales modificaciones macroestructurales que tienen lugar en la matriz miofibrilar proteica durante la maduración. Para ello, se analizaron perniles con distinto grado de curado (fresco, salado, post-salado, secado y bodega) y músculos con distinta localización anatómica (bíceps femoral, semimembranoso y semitendinoso). Se obtuvieron los parámetros T_1 , T_2 y CDA para cada etapa y músculo y se observó una progresiva disminución de los mismos con el tiempo de curado, asociada a las cinéticas de deshidratación y difusión de sal. Asimismo, se establecieron modelos matemáticos para el cálculo del contenido en agua y sal y características reológicas a partir de los parámetros adquiridos mediante IRM.

Trabajo 2. Estudio de la microestructura de jamón curado mediante relaxometría de RMN.

Con el fin de profundizar en las modificaciones estructurales que conlleva el proceso de curado de jamón se realizó un estudio mediante relaxometría T_2 de RMN. Esta metodología permitió desgranar los valores medios de los tiempos de relajación T_2 mediante la obtención de distribuciones continuas del tiempo de relajación. Así, se obtuvo información relevante a nivel microestructural. Se identificaron tres

componentes T_2 en las muestras cárnicas, en función del grado de asociación de los protones de la muestra con la matriz proteica: T_{2b} , T_{21} , T_{22} . T_{2b} es el componente minoritario de relajación más rápida y se relaciona con los protones fuertemente asociados a macromoléculas; T_{21} es el componente mayoritario en las muestras cárnicas y representa a los protones del agua retenidos por el entramado miofibrilar proteico; finalmente, el componente T_{22} es la población de protones más móviles, de relajación más lenta. Además, se identificó un cuarto componente (T_2') a partir de la etapa de secado asociado a los protones de la fase grasa. La obtención de imágenes microscopía electrónica de barrido (MEB) resultó de gran ayuda para interpretar las modificaciones estructurales. Su análisis permitió observar la reducción del tamaño intrínseco de poro de la matriz proteica, debido a los fenómenos de solubilización proteica, absorción de sal y deshidratación, típicos del curado, así como la visualización de la evolución de la infiltración grasa en el músculo. Además, se comprobó que el componente T_{21} está fuertemente relacionado con la fuerza de rotura calculada mediante la realización de ensayos de tracción uniaxial destructivos.

Trabajo 3. Estudio del proceso de proteólisis durante la maduración de modelos cárnicos elaborados a base de carne picada.

En este trabajo se estudió el proceso de proteólisis que tiene lugar durante la maduración de modelos cárnicos elaborados a partir de carne de cerdo y que es especialmente relevante para conseguir las características del producto final. Para ello, se elaboraron dos lotes de modelos cárnicos, con (SMS) y sin proteasas (SMS+P), con el fin de estudiar mediante relaxometría T_2 las diferencias en la microestructura de los dos tipos de productos generados. Se realizaron, además, análisis electroforéticos para comparar el perfil de degradación de las fracciones proteicas en ambos lotes. El comportamiento de degradación fue bastante diferente (mucho más intenso en el lote con proteasas), así como las distribuciones de los tiempos de relajación T_2 obtenidas para cada lote. En ambos casos, se identificaron distintas poblaciones de protones (T_{2b} , T_{21} , T_{22}) que experimentaron cambios durante la maduración, reduciéndose los tiempos de relajación a medida que avanzó el proceso. Estructuralmente, los modelos con proteasas se caracterizaron por matrices más fluidas y mucho menos organizadas, lo cual se puso de manifiesto a través de las poblaciones T_{2b} y T_{22} .

Trabajo 4. Distribución y movilidad de agua durante el proceso de elaboración de embutidos crudos curados y su relación con características fisicoquímicas y reológicas.

En este trabajo se empleó la relaxometría T_2 para estudiar la microestructura de embutidos crudos curados, recreando las condiciones típicas de un proceso de elaboración tradicional durante un total de 14 días. Se elaboraron embutidos tipo chorizo y tipo salchichón con distintos niveles de grasa y se analizaron a distintos tiempos de maduración. Se obtuvieron distintas poblaciones de protones: T_{2b} , T_{21} , T_{22} . El avance de la maduración estuvo marcado por la fermentación microbiana de la masa cárnica, que indujo cambios en la matriz proteica debido al descenso de pH y que se han relacionado con la aparición de la población T_{22} , y la deshidratación, que marcó la reducción de los tiempos de relajación durante todo el proceso. El análisis del perfil de textura (TPA) se realizó también en los tiempos de análisis para evaluar la evolución estructural de la matriz cárnica mediante un método tradicional. El análisis de *clusters* reveló una clara discriminación entre muestras según su tiempo de maduración y el coeficiente de correlación de Pearson se utilizó para establecer el grado de dependencia lineal entre T_2 -parámetros fisicoquímicos y T_2 -características de textura. La población mayoritaria T_{21} mostró un grado de dependencia más fuerte, especialmente con el contenido en agua ($r=0,93$) y la dureza ($r=0,87$), mientras que las otras poblaciones, T_{2b} y T_{22} , mostraron un grado de asociación mucho más débil con los parámetros fisicoquímicos y de textura.

Trabajo 5. Monitorización del proceso de elaboración de jamón curado mediante espectroscopía de RMN de alta resolución.

En este trabajo se empleó la metodología ^1H RMN HRMAS (*high resolution magic angle spinning*) para monitorizar los cambios en el perfil metabólico de la carne de cerdo blanco sometida a un proceso tradicional de curado. El análisis de componentes principales (PCA) permitió establecer la discriminación entre muestras y agrupar los espectros obtenidos en función de su etapa de maduración. Fue posible identificar gran cantidad de metabolitos diferentes. El avance de la maduración en jamón curado se tradujo en un incremento en las señales de ácidos grasos, favorecida por la concentración de macromoléculas debido a la deshidratación, y a la actividad enzimática (lipólisis). Se observó también la degradación de nucleótidos y la reducción de las

señales de carbohidratos, debido al consumo de azúcares. Así mismo, se produjo un aumento en las señales correspondientes a aminoácidos, debido a los fenómenos proteolíticos implicados en el desarrollo del flavor, especialmente notable en la región de los aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano.

Trabajo 6. Identificación de los principales metabolitos presentes en embutidos crudos curados y evolución de los mismos durante el proceso de maduración.

Con el fin de monitorizar los cambios bioquímicos acontecidos durante la maduración, y de esta forma, contar con una visión global de los cambios madurativos, en este trabajo se llevó a cabo el estudio del perfil metabólico de embutidos tipo salchichón mediante la espectroscopía ^1H RMN HRMAS. Se identificaron un gran número de metabolitos, tanto propios de la carne como de adición, y fue posible estudiar su variación cuantitativa durante las etapas de fermentación y maduración. El análisis metabolómico de las muestras analizadas permitió diferenciar los procesos de fermentación y maduración e hizo posible la clasificación de las muestras en función del tiempo de maduración a través del Análisis de Componentes Principales (PCA).

Trabajo 7. Valoración de los exudados de cerdo como matriz apta para la monitorización de la conservación de la carne tratada con electrones acelerados.

En este trabajo se presenta por primera vez el perfil metabólico de los exudados de cerdo obtenido mediante la metodología ^1H RMN HRMAS. Se propone emplear los exudados de cerdo como matriz de análisis para identificar los procesos y las transformaciones habituales que tienen lugar durante el almacenamiento de la carne sometida a un tratamiento de conservación basado en la aplicación de electrones acelerados. Se observó que tanto la dosis del tratamiento como el tiempo de almacenamiento de las muestras tratadas tienen un efecto notable sobre los metabolitos cárnicos que pueden ser percibidos a partir de los datos espectrales obtenidos. Además, la aplicación de herramientas quimiométricas al conjunto de datos espectroscópicos puso de manifiesto cuáles fueron los metabolitos que experimentaron variaciones significativas durante el almacenamiento de la carne. La clasificación de las muestras de carne de acuerdo a su tiempo de almacenamiento se realizó a través del

Análisis de Componentes Principales (PCA). Con este mismo procedimiento fue posible la discriminación entre muestras tratadas y no tratadas con electrones acelerados.

CONCLUSIONES

Se concluye, de forma general, que las técnicas de RMN (IRM, relaxometría y espectroscopía de alta resolución) presentan un gran potencial para monitorizar, desde un punto de vista tanto estructural como bioquímico, los procesos de elaboración de derivados cárnicos, como el jamón curado y los embutidos crudos curados, así como procedimientos habituales en la industria alimentaria, como la conservación de productos. Se confirma, por tanto, su aptitud para la trazabilidad y el control de calidad de miosistemas cárnicos.

INTRODUCTION

Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-based techniques are non-destructive analytical tools that provide valuable information about the meat matrices at both structural and biochemical level. On the one hand, the potential of Magnetic Resonance Imaging (MRI) to study the macrostructure of muscular pieces was studied. On the other hand, the aptitude of T_2 NMR relaxometry for the study and characterization of the microstructure of meat myosystems was evaluated and, finally, the potential of the high-resolution NMR spectroscopy for the study of the metabolic profile of intact samples of muscle and meat exudates was verified. These techniques allow to analyze complex matrices quickly, with minimum sample preparation and their non-invasive and non-destructive nature increases their area of application.

EXPERIMENTAL DESIGN

NMR was used for the study of different meat myosystems. On the one hand, a meat derivative elaborated from an entire piece, cured ham, was analyzed. On the other hand, different products were elaborated from minced meat: meat models and raw cured sausages, *chorizo* and *salchichón* type. A linear study to monitor the ripening process of these products was outlined, in order to track the structural (by means of MRI and T_2 NMR relaxometry) and biochemical changes (by means of NMR spectroscopy) experienced by the meat matrices during processing. In addition, NMR spectroscopy was used for the analysis of liquid samples coming from meat myosystems (exudates) and to evaluate its potential as analytical matrix to monitor the conservation process of pork.

OBJECTIVES

Two general aims have been approached:

- To evaluate the potential of NMR non-destructive technologies (MRI and T_2 NMR relaxometry) to monitor the ripening process of different meat derivatives (cured ham, meat models and raw cured sausages) through the macro and microstructural changes experienced by the mentioned myosystems along their manufacturing process.
- To value high-resolution NMR spectroscopy aptitude for monitoring different industrial processes using intact muscular samples, including ripening and conservation, and samples of liquid nature (exudates).

RESULTS

Different partial aims have been confronted along several stages, as indicated below. The obtained results have led to seven articles included in this memory.

Paper 1. Use of MRI as a predictive tool for physicochemical and rheological features during ham manufacturing.

In this work, MRI is described as predictive tool for the estimation of physicochemical characteristics and textural parameters. This technique allowed the monitoring of the manufacturing process of the product, revealing the principal macrostructural modifications that take place in the myofibrillar matrix during ripening. For that purpose, hams at different ripening times (raw, salted, post-salted, half-cured and cured) and muscles with different anatomical location (*biceps femoris*, *semimembranosus* and *semitendinosus*) were analyzed. T_1 , T_2 and ADC parameters were obtained for each stage and muscle and a progressive decrease was observed during ripening, related to the dehydration kinetics and salt diffusion. Additionally, mathematical models were established for the calculation of the water and salt content and rheological features from the MRI parameters.

Paper 2. Dry cured ham microstructure study by means of T_2 NMR relaxometry.

In order to delve into the structural modifications that occur throughout the manufacturing process of dry cured ham, a T_2 NMR relaxometry study was realized. This technique allowed to separate the average values of T_2 in several populations by obtaining the constant distributions of the relaxation times. Thus, relevant information was obtained at microstructural level. Three different T_2 components were identified in the meat samples, depending on the degree of association of the protons of the sample with the protein matrix: T_{2b} , T_{21} , T_{22} . T_{2b} is the minority component with the shortest relaxation time and it is related to the protons strongly associated with macromolecules; T_{21} is the main component in the meat samples and it represents the protons of the water retained by the myofibrillar proteins; finally, the T_{22} component is the population representing the most mobile protons, with long relaxation times. In addition, a fourth component (T_2') was identified during the half-cured stage and it has been related to the protons of the fat phase. The obtaining of scanning electron microscopy (SEM) images

was very helpful to interpret the structural modifications. The SEM images analysis allowed to observe the reduction of the intrinsic pore size of the meat matrix, due to protein solubilization, absorption of salt and dehydration, typical transformations along curing, as well as the visualization of the evolution of fat infiltration inside the muscle. In addition, it was verified that T_{21} population is highly correlated to the breaking force calculated by means of destructive uniaxial tensile test.

Paper 3. Proteolysis process in fermented sausage model systems as studied by NMR relaxometry.

In this work, the proteolysis process that takes place during the ripening of meat models elaborated from pork, particularly relevant to obtain the characteristics of the final product, was studied. For that purpose, two batches of meat models were elaborated, with (SMS) and without proteases (SMS+P), in order to study the differences in the microstructure of both types of products by means of T_2 NMR relaxometry. In addition, electrophoretic analyses were conducted to compare the myofibrillar proteins degradation pattern in both batches. The behavior of degradation was significantly different (much more intense in the batch with proteases), as well as the distributions of the T_2 relaxation time obtained for each batch. In both cases, different water populations (T_{2b} , T_{21} , T_{22}) were identified. The mentioned populations experienced changes during ripening, being reduced the relaxation times as the process progressed. Structurally, models with proteases were characterized by a more fluid and much less organized matrix, which was revealed by T_{2b} and T_{22} populations.

Paper 4. Water mobility and distribution during dry-fermented sausages “Spanish type” manufacturing and its relationship with physicochemical and textural properties: a low-field NMR study.

T_2 NMR relaxometry was used to study the microstructure of raw cured sausages, recreating the typical conditions of a traditional process of production during a total of 14 days. *Chorizo* and *salchichón* type sausages with different levels of fat were analyzed at several ripening times. Different water populations were obtained: T_{2b} , T_{21} , T_{22} . The progress of ripening was characterized by the microbial fermentation of the meat mass, that generate changes in the myofibrillar matrix due to the decrease of pH and that have

been related to the appearance of the T_{22} population, and the dehydration, which marked the reduction of the relaxation times throughout the entire process. The texture profile analysis (TPA) was also conducted to evaluate the structural evolution of the meat matrix by a traditional method. The analysis of clusters revealed a clear discrimination between samples according to their ripening time and Pearson's correlation coefficient was used for establishing the degree of linear dependence between physicochemical features- T_2 parameters and T_2 - textural characteristics. The main population T_{21} showed a stronger dependence, especially with water content ($r=0,93$) and hardness ($r=0,87$), whereas other populations, T_{2b} and T_{22} , showed a weaker association with the physicochemical and textural parameters.

Paper 5. Use of ^1H NMR HRMAS methodology for monitoring cured ham manufacturing.

^1H RMN HRMAS (high resolution magic angle spinning) methodology was used to monitor the changes in the metabolic profile of pork submitted to a traditional manufacturing process. Principal components analysis (PCA) allowed to establish the discrimination between samples and to group the obtained spectra depending on the ripening stage. It was possible to identify a great quantity of metabolites. During cured ham ripening an increase in the fatty acids signals, favored by the concentration of macromolecules due to the dehydration, and to the enzymatic activity (lipolysis) was reported. The degradation of nucleotides and the reduction of the carbohydrates signals, due to sugars consumption was also observed. Additionally, an increase in the signals corresponding to amino acids was detected, due to the proteolytic phenomena involved in the development of the flavor, mainly remarkable in the aromatic amino acids region, phenylalanine, tyrosine and tryptophan.

Paper 6. ^1H NMR-based metabolomics analysis for dry-fermented sausage characterization.

In order to monitor the biochemical changes happened during ripening and, thus, to possess a global vision of the maturative changes, in this work the study of the metabolic profile of *salchichón* type sausages by ^1H RMN HRMAS spectroscopy was performed. A great number of metabolites were identified, both meat metabolites and

metabolites of addition, and it was possible to study their quantitative variation during the stages of fermentation and ripening. Metabolomics allowed to separate the processes of fermentation and ripening and the classification of the samples depending on the ripening time by PCA.

Paper 7. Evaluation of E-beam irradiation and storage time in pork exudates using NMR metabolomics

In this work, the metabolic profile of pork exudates was obtained by ^1H RMN HRMAS methodology for the first time. It proposes to use of exudates as a suitable matrix to identify the processes and the habitual transformations that take place during the storage of the meat treated with E-beam irradiation. It was observed that both the dose of the treatment and the storage time of the treated samples have a notable effect on the meat metabolites that can be perceived from the spectral information obtained. In addition, the application of chemometric tools to the set of spectroscopic information revealed which were the metabolites that experimented significant variations during the meat storage. The classification of samples was performed according to the storage time by PCA. The same procedure was used for the discrimination between samples treated and not treated with E-beam irradiation.

CONCLUSIONS

NMR techniques (MRI, T_2 relaxometry and high-resolution NMR spectroscopy) have a great potential to monitor, from both a structural and biochemical point of view, the manufacturing process of meat derivatives, cured ham and raw cured sausages, as well as habitual procedures in the food processing industry, as the conservation of products. NMR aptitude for the traceability and the quality control of meat myosystems is, therefore, verified.

I. Introducción

*La introducción de esta memoria se ha estructurado en cuatro apartados, en los que se pretende abordar los distintos aspectos implicados en el desarrollo del trabajo doctoral realizado. En un **primer apartado** se describen las particularidades de las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear que se proponen como herramientas de análisis alternativas para el estudio de matrices alimentarias. En un **segundo apartado** se ubica la industria cárnica española, a la que va orientado el estudio realizado, y se trata la repercusión económica y características de este sector. La **tercera parte** se centra en la carne de porcino y sus características. Finalmente, en la **cuarta parte** se abordan las particularidades del proceso de elaboración de los productos cárnicos analizados: embutidos y jamón curado. En conjunto, se pretende establecer el marco de trabajo y el perfil de los objetivos propuestos.*

I.1. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Dada la importancia, tanto nutricional como económica, de la carne y sus derivados se hace necesaria la búsqueda y desarrollo de nuevas herramientas que faciliten su estudio y análisis. El empleo de la resonancia magnética nuclear como técnica analítica en alimentos es reciente y, sin embargo, muy fructífero, dadas sus ventajas sobre otras técnicas similares y su elevado potencial para el análisis de matrices alimentarias sólidas, líquidas y semisólidas. A continuación, se abordan una serie de generalidades sobre la técnica, así como su fundamento y sus distintas variantes de aplicación en el análisis de alimentos.

I.1.1. CONTEXTO HISTÓRICO

La RMN es una técnica espectroscópica que estudia la interacción entre la materia y la radiación electromagnética basándose en las propiedades magnéticas intrínsecas de los núcleos atómicos. Hoy en día, la RMN es una técnica analítica ampliamente consolidada con un gran potencial de aplicación en distintas áreas de conocimiento, entre las que se encuentran la química, la biología, la medicina, la ciencia de los materiales o la geología, y a las que se ha sumado recientemente, la ciencia y tecnología de los alimentos, aportando valiosa información sobre estructura y composición, lo que le concede un gran potencial para el control de la calidad y seguridad alimentaria (Emsley & Feeney, 2007).

En su historia se mezclan matemáticos, físicos, químicos, ingenieros y médicos (Figura I.1) que conjuntamente lograron articular una técnica analítica de resultado extraordinario que ha supuesto una revolución, tanto en la Imagen para el diagnóstico como en la determinación estructural mediante técnicas espectroscópicas.

En 1946, el físico suizo Félix Bloch (Universidad de Stanford) y el ingeniero eléctrico estadounidense Edward M. Purcell (Universidad de Harvard) desarrollaron, de manera independiente, nuevos métodos que permitieron medir por primera vez la señal de resonancia magnética nuclear (Bloch, 1946; Purcell *et al.*, 1946). Ambos científicos compartieron el Nobel de Física en 1952 por dicho hallazgo.

En 1973 se produjeron avances fundamentales en la aplicación de la RMN a la medicina, cuando el químico estadounidense Paul Lauterbur (Universidad Estatal de New York) codificó espacialmente la señal de RMN mediante la aplicación de gradientes magnéticos (Lauterbur, 1973) y el físico inglés Peter Mansfield amplió el uso y el desarrollo de los gradientes y demostró que la señal se puede analizar matemáticamente, lo que ha hecho que la imagen de RM se haya convertido en una técnica de imagen útil y de uso clínico (Mansfield & Grannell, 1973). Por estos avances ambos investigadores fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina en el año 2003.

En 1966, el químico-físico suizo Richard Ernst (ETH de Zúrich) introdujo la codificación en fase y frecuencia junto con la transformada de Fourier, que constituyen las bases de la técnica actual. En 1975, Ernst y colaboradores desarrollaron el concepto de RMN bidimensional e introdujeron sus primeras aplicaciones (Aue *et al.*, 1976). Ernst fue galardonado con el premio Nobel de Química en 1991 por su contribución al avance de la espectroscopía de RMN.

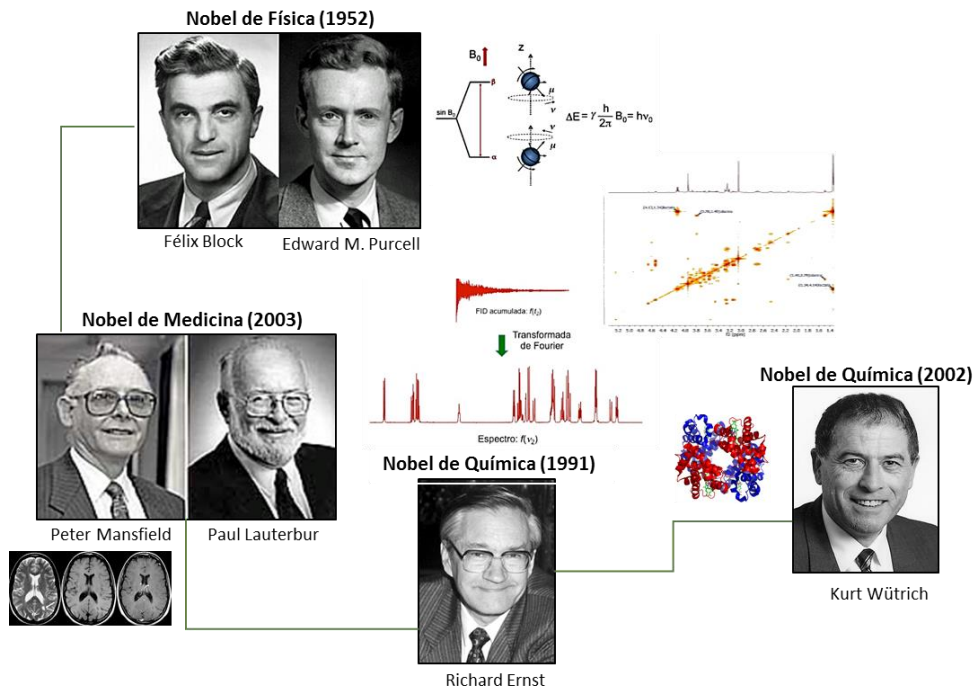


Figura I.1. Principales personajes contribuyentes al desarrollo de la RMN.

A comienzos de la década de los 80, el químico suizo Kurt Wüthrich (ETH de Zúrich) estudió la aplicación de la RMN a la elucidación estructural de proteínas, desarrollando procedimientos generales para la asignación sistemática de las frecuencias de resonancia de los diferentes núcleos magnéticos de estas biomoléculas y demostró que a partir de esta información se podía deducir la estructura tridimensional de determinadas proteínas (Wüthrich, 1974). Por ello, recibió el Premio Nobel de Química en el año 2002.

En las últimas décadas, la RMN ha ido ganando protagonismo como técnica para la elucidación estructural de moléculas aisladas y para el estudio del metabolismo, tanto *in vivo* como *in vitro*. En la primera década del siglo XXI, se propone el término *Metabonomía* (Fiehn, 2001) para hacer referencia a la medición cuantitativa de la respuesta metabólica de naturaleza dinámica y multiparamétrica de los sistemas vivos ante estímulos patofisiológicos o bien, ante la modificación genética. Desde entonces, se ha trabajado para conseguir el aumento de la sensibilidad de la técnica gracias a la utilización de campos magnéticos cada vez más intensos, a la combinación con técnicas de polarización y al desarrollo de nuevas sondas de radiofrecuencia.

El gran potencial de análisis de las técnicas de RMN y sus ventajas frente a otras técnicas analíticas han favorecido, en las últimas décadas, su incorporación a la Ciencia y Tecnología de Alimentos. La RMN es una técnica rápida, no invasiva y no destructiva, que no requiere preparación de la muestra (IRM) o es mínima (RMN). Es apta para el análisis de matrices sólidas, semisólidas y líquidas, permitiendo obtener tanto el perfil metabólico del alimento, como información molecular de forma cuantitativa. Además, presenta un gran potencial para el estudio estructural de matrices alimentarias. En los últimos años, la aplicación de esta técnica de alto rendimiento está permitiendo alcanzar nuevos y ambiciosos objetivos en el análisis de alimentos (Laghi *et al.*, 2014).

I.1.2. FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La RMN se basa en un fenómeno físico por el cual los núcleos atómicos con un número impar de protones (Z) y/o un número impar de neutrones (N) (espín nuclear, $I \neq 0$, no nulo) pueden absorber selectivamente energía generalmente en el rango de la

radiofrecuencia (RF) al ser sometidos a la acción de un campo magnético (Figura I.2). Entre los grupos que presentan el fenómeno de la resonancia magnética se encuentran los principales núcleos presentes en los tejidos biológicos (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P) que tienen número de espín $I=1/2$. Una vez los núcleos han absorbido la energía y cesa el aporte energético externo, estos mismos núcleos devuelven la energía absorbida para regresar a su situación de equilibrio termodinámico. Esta liberación energética induce una señal eléctrica en una antena receptora a partir de la cual se puede obtener una imagen o un espectro.

En base a estos principios, es posible diferenciar varias técnicas de RMN en función de la información que aportan sobre la matriz analizada. Por una parte, la **imagen de RMN**, mediante el empleo de gradientes de campo magnético, permite codificar la señal de resonancia y adquirir imágenes de los diferentes tejidos presentes, aportando información sobre su estructura y composición (Herrero *et al.*, 2009); la **relaxometría de RMN** es una técnica que se centra en el estudio y medición de los tiempos de relajación característicos de resonancia aportando información sobre la naturaleza físico-química de ciertos núcleos en términos de movilidad y compartimentación (Bertram & Andersen, 2004); por último, la **espectroscopía de RMN** permite identificar, cuantificar y monitorizar los metabolitos presentes a través de las señales espectrales (Castejón *et al.*, 2015).

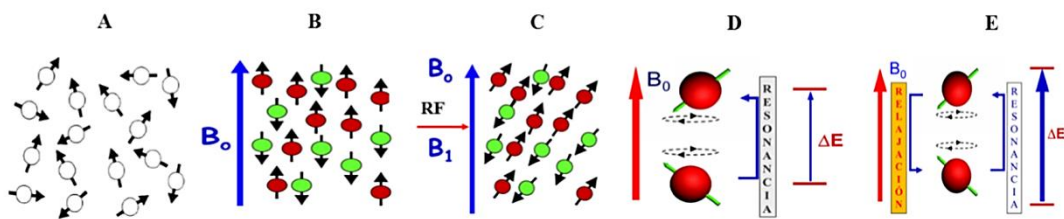


Figura I.2. Secuencia de un proceso de RMN. A: orientación al azar de espines. B: aplicación de un campo magnético B_0 y orientación de espines. C: aplicación de un pulso de radiofrecuencia B_1 . D: absorción de energía. E: relajación nuclear.

La secuencia de la Figura I.2 es común a todos los experimentos de RMN, de manera que un experimento de RMN consiste en la aplicación de un pulso o n pulsos de radiofrecuencia que conducen a la obtención de la señal final que será adecuadamente procesada para su posterior análisis.

Cuando los núcleos absorben la energía de RF aparece un vector de magnetización (M) orientado en la dirección del campo magnético cuyo valor depende de la densidad de núcleos (Figura I.3). M tiene dos componentes: magnetización longitudinal (M_z) y magnetización transversal (M_{xy}).

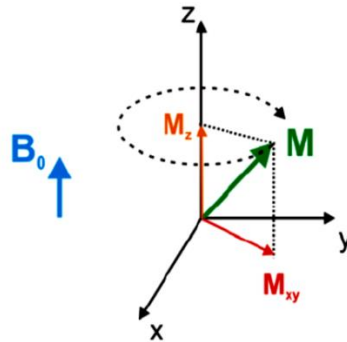


Figura I.3. Representación de la magnetización en el plano x, y, z .

Cuando cesa el pulso de radiofrecuencia, la magnetización vuelve a su orientación inicial mediante el proceso de relajación nuclear que se verá muy influenciado por la estructura y el entorno bioquímico en el que se encuentran los núcleos. La recuperación de la magnetización tiene una componente longitudinal y otra transversal.

Relajación longitudinal: los protones liberan progresivamente su exceso energético. Cuando el valor de la proyección sobre el eje longitudinal (M_z) sea idéntico al valor inicial de M , la relajación habrá terminado (Figura I.4). El estudio de la relajación longitudinal, M_z , informa sobre la rapidez con la que se alcanza de nuevo el estado inicial, aportando información estructural de la muestra de estudio, así como de la composición de los tejidos presentes. La relajación longitudinal tiene forma de un exponencial creciente regulada por una constante de tiempo, denominada constante de relajación longitudinal T_1 (Figura I.4). Cuanto menor es el valor de T_1 , más rápido se alcanza el estado de equilibrio, es decir, más rápida es la relajación. El tiempo de relajación T_1 representa la velocidad con la que los protones intercambian energía con el medio ambiente (relación ^1H -medio). Se denomina también relajación espín-medio o *spin-lattice* (Berendsen, 1992).

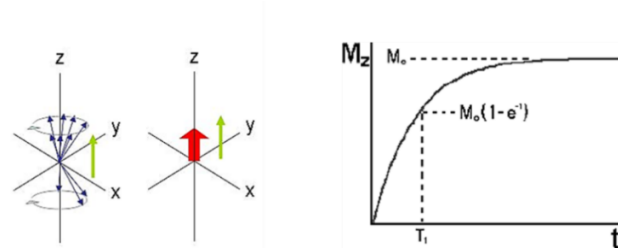


Figura I.4. Representación de la relajación longitudinal T_1 .

Relajación transversal: las variaciones con el tiempo de la componente sobre el plano transversal x,y de la magnetización durante la relajación o relajación transversal (M_{xy}) aportan información relacionada con la estructura bioquímica del medio (Figura I.5). La variación de la relajación transversal se representa por una exponencial decreciente regulada por la constante de relajación T_2 .

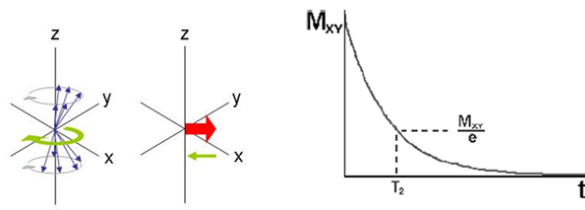


Figura I.5. Representación de la relajación transversal T_2 .

Después del pulso de radiofrecuencia todos los espines están en fase. Al retirar la energía, con el tiempo, esta coherencia se va perdiendo, desfasándose progresivamente debido a las diferencias en los campos magnéticos que perciben los núcleos (Figura I.6). La relajación T_2 es el resultado de interacciones entre los espines (relación $^+H - ^+H$). Se denomina también relajación *spin-spin* (Berendsen, 1992).

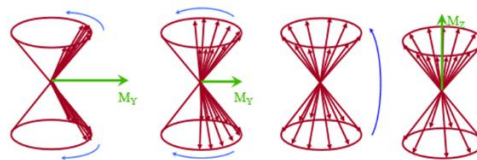


Figura I.6. Evolución de la proyección de los espines sobre el plano transversal después de un pulso de radiofrecuencia.

Para poder establecer correlaciones estructurales a partir de la señal transmitida por los núcleos, es necesario transformar la señal original mediante la aplicación de una

operación matemática conocida como la *Transformada de Fourier* (TF), que finalmente da lugar a una imagen o a un espectro de RMN. La señal es captada originariamente como una curva sinusoidal amortiguada, denominada FID (*Free Induction Decay*). Se trata de una señal dependiente del tiempo $f(t)$, que recoge todas las resonancias individuales generadas por los núcleos que poseen frecuencias diferentes. La FID se adquiere durante un intervalo t_2 (tiempo de adquisición) y seguidamente se somete a un proceso de digitalización y almacenamiento. Esta situación se repite tantas veces como sea necesario hasta alcanzar una FID acumulada con la intensidad o relación señal/ruido (S/R) suficiente. La FID acumulada es dependiente del tiempo, $f(t_2)$. La transformada de Fourier se utiliza para convertir la FID en una señal dependiente de las frecuencias que permita extraer la información espectroscópica, $f(\nu_2)$. (Figura I.7).

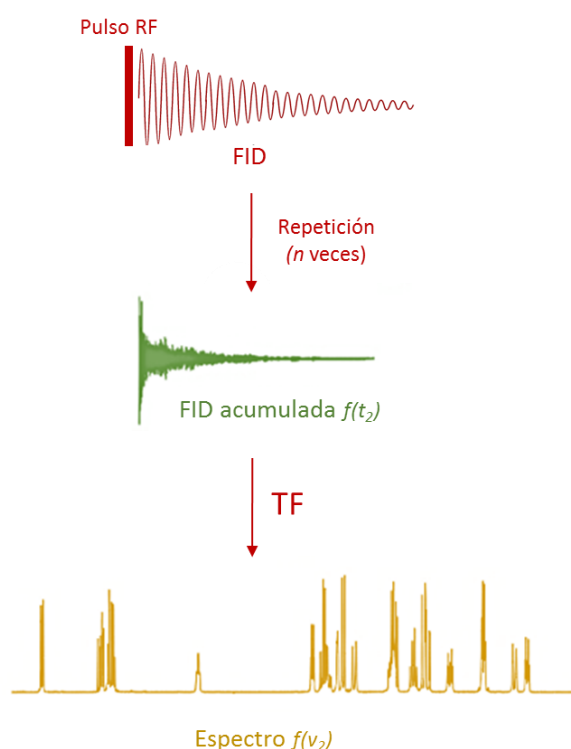


Figura I.7. Registro de la FID, acumulación y transformada de Fourier.

Durante el proceso de obtención de imágenes de RM, mediante el uso de gradientes de campo magnético, es decir, la variación del campo magnético principal a lo largo de una dirección del espacio, se puede obtener información espacial. Cuando los gradientes se aplican en las tres direcciones del espacio se obtendrá información tridimensional, lo

que nos permitirá obtener una imagen de resonancia (Figura I.8). En este caso no se adquiere la FID directamente ya que ésta desaparece muy rápidamente. Mediante el uso de gradientes y pulsos de RF es posible reenfocar la señal de resonancia. La señal así reenfocada se denomina eco. El conjunto de ecos se denomina espacio K y es la representación del contenido en frecuencias espaciales del objeto.

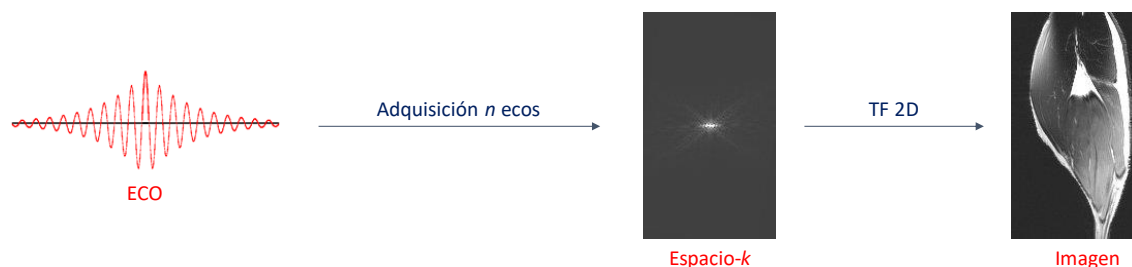


Figura I.8. Formación de las imágenes de RM: adquisición de n ecos, construcción del espacio-k, obtención de la imagen mediante una transformada de Fourier en 2 dimensiones.

A modo de aclaración, cabe mencionar que la RMN es fundamentalmente de ^1H , por esta razón, a lo largo de esta memoria, se usan indistintamente las palabras espines, núcleos y protones.

I.1.3. METODOLOGÍAS DE RMN EN ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Los alimentos son sistemas complejos tanto a nivel estructural como a nivel bioquímico. Desde el punto de vista estructural, se pueden establecer distintos niveles de organización. El modelo más general divide la estructura del alimento en microscópica (en el rango de 0,1-100 μm) y macroscópica ($>100 \mu\text{m}$) (Ramírez *et al.*, 2009). Desde el punto de vista bioquímico, los alimentos están constituidos por un gran y variado número de metabolitos. Ambas, la organización estructural y la composición metabólica repercuten directamente sobre las características del producto final (apariencia, textura, jugosidad, etc.) percibidas por el consumidor. El creciente interés por ampliar conocimientos sobre la formación, estabilidad y composición de las estructuras conlleva el empleo de nuevas técnicas analíticas. En este contexto, la imagen de resonancia magnética (IRM) y la relaxometría son metodologías que pueden ser empleadas para obtener información estructural, macro y microscópica,

respectivamente, sobre las matrices alimentarias, mientras que, la espectroscopía de RMN, permite la identificación y cuantificación de los diferentes metabolitos presentes.

I.1.3.1. Imagen de Resonancia Magnética (IRM)

Como ya hemos visto, la IRM es una técnica a través de la cual las señales de RMN son codificadas espacialmente utilizando gradientes de campo magnético y reconstruidas en un formato de imagen (Liang & Lauterbur, 2000). La imagen de RMN consiste en una matriz bidimensional de valores de intensidad (píxeles), que son las señales de pequeños volúmenes dentro de la muestra (vóxeles). Cada píxel representa la información tridimensional contenida en un vóxel (Figura I.9).

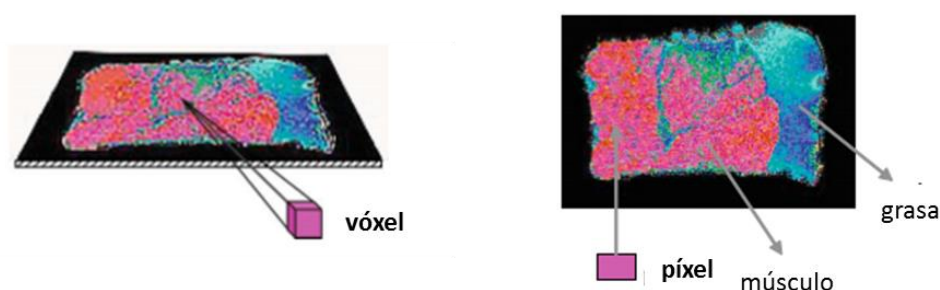


Figura I.9. Imagen de resonancia magnética de la sección interna de jamón. La imagen bidimensional consiste en una matriz de píxeles; el valor numérico de cada píxel viene dado por la señal del elemento de volumen o vóxel. La parte muscular y grasa se diferencian claramente (Fantazzini et al., 2009).

En función de los diferentes parámetros seleccionados durante la adquisición [tiempo de eco (TE) y tiempo de repetición (TR)], podremos potenciar la imagen de resonancia en cada uno de los parámetros característicos [tiempos de relajación longitudinal (T_1) y transversal (T_2) y la densidad protónica (DP)], que dependerán de las propiedades inherentes de la muestra (Mitchel et al., 2001). Además, como resultado de la agitación térmica, las moléculas presentan un movimiento de traslación al azar conocido como movimiento Browniano o de difusión molecular. La IRM es sensible a la difusión molecular, que a diferencia del T_1 y T_2 , es independiente del valor de la intensidad del campo magnético y permite la visualización y el cálculo de la difusión molecular *in vivo*, directamente a partir de los movimientos moleculares de traslación del agua libre. Por tanto, de cada vóxel se puede obtener información sobre los

parámetros ligados a la estructura y movilidad molecular (T_1 y T_2) y acerca de la velocidad aparente de difusión del agua [coeficiente de difusión aparente (CDA)].

Dependiendo del parámetro que tenga más peso en el contraste de la imagen, existen distintos tipos de imágenes de RMN. A estas adquisiciones diferenciadas se las denomina **potenciaciones** y se consiguen mediante la aplicación de distintos pulsos de radiofrecuencia, gradientes de campo magnético y la modificación de los parámetros de adquisición para incrementar o ponderar un determinado efecto a fin de maximizar el contraste entre tejidos específicos. Así, se habla de:

- **Imágenes potencias en DP:** cuando el contraste de la imagen resultante es proporcional a la concentración de núcleos de ^1H .
- **Imágenes potenciadas en T_1 :** son imágenes en las que la contribución del T_2 y la DP son despreciables y el valor del píxel dependerá prácticamente sólo del T_1 del vóxel. La intensidad de la imagen es inversamente proporcional al tiempo de relajación longitudinal, de modo que, los protones con valores de T_1 más cortos darán lugar a hiperintensidades en la imagen de resonancia mientras que los que tienen tiempos de relajación longitudinal más largos aparecerán hipointensos.
- **Imágenes potenciadas en T_2 :** el contraste, en este tipo de imágenes, es dependiente del tiempo de relajación transversal, T_2 . A diferencia de las imágenes potenciadas en T_1 , la intensidad de señal en las imágenes potenciadas en T_2 es directamente proporcional al valor de T_2 de los protones. Los píxeles con mayor tiempo de relajación T_2 aparecen más brillantes que los píxeles con menor valor de T_2 .
- **Imágenes potenciadas en difusión:** el contraste de la imagen es inverso al valor del coeficiente de difusión aparente.

En función de lo que se desea estudiar, se seleccionarán los parámetros adecuados para obtener el contraste deseado. Las potenciaciones más comunes se resumen en:

- Para obtener imágenes potenciadas en DP se seleccionará un TE corto y un TR largo.

- Para obtener imágenes potenciadas en T_1 se seleccionarán valores de TE y TR cortos.
- Para obtener imágenes potenciadas en T_2 se seleccionarán valores de TE y TR largos.

Para poder calcular los valores de los tiempos de relajación a partir de una serie de imágenes, generalmente, se define un experimento en el que se fija uno de los parámetros de adquisición, por ejemplo, TR o TE, y se hace variar otro, por ejemplo, TE o TR. Así, se pueden obtener los mapas paramétricos. Los mapas son imágenes en los que el valor de la intensidad del píxel es el valor del parámetro. Dependiendo del parámetro que se haya calculado hablaremos de mapas del tiempo de relajación T_1 , T_2 , mapas de DP, mapas de CDA, etc. El valor del parámetro se suele extraer como media de todos los valores en una región de interés seleccionada [(*region of interest* (ROIs))]. A diferencia de las imágenes, en los mapas, una intensidad mayor de la imagen paramétrica siempre significa un valor mayor del parámetro (Tabla I.1).

Tabla I.1. Comparativa de imágenes vs mapas de IRM.

	Imagen	Mapa
T_1	$\propto 1/T_1$	$\propto T_1$
T_2	$\propto T_2$	$\propto T_2$
CDA	$\propto 1/CDA$	$\propto CDA$
DP	$\propto [^1H]$	$\propto [^1H]$

La IRM permite obtener información estructural de la matriz de estudio de manera no destructiva/no invasiva. Una de sus principales ventajas es que hace posible la observación del interior del alimento, lo que no solo permite diferenciar entre tejidos, sino que también posibilita la monitorización de procesos de degradación, maduración, transformación o conservación sin alteración de la muestra (Damez y Clerjon, 2008). Por ello, es una técnica con un gran potencial para la clasificación y la determinación de calidad de los alimentos de forma directa en las propias líneas de producción. Concretamente en carnes, se ha propuesto como método de clasificación de piezas en función de su contenido en grasa (Mitchell *et al.*, 2001; Caro *et al.*, 2003), lo cual podría derivar en su empleo como método de clasificación de canales en matadero. Como se

verá durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, y como previamente ha propuesto en otros estudios (Cernadas *et al.*, 2005), a partir de la imagen, es posible, incluso, predecir atributos de calidad que se obtienen tradicionalmente mediante técnicas destructivas, como las características sensoriales.

I.1.3.2. Relaxometría

Mediante esta técnica es posible el estudio y medición de los tiempos de relajación longitudinal, T_1 , y transversal, T_2 .

Una señal de RMN puede caracterizarse, principalmente, por tres propiedades (Berendsen, 1992):

- Su frecuencia de resonancia.
- Su relajación longitudinal, T_1 .
- Su relajación transversal, T_2 .

De ellas, la frecuencia de resonancia es la que menos información proporciona. Sin embargo, los tiempos de relajación T_1 y T_2 se han utilizado en un gran número de estudios con matrices alimentarias a fin de extraer información estructural. Como ya se ha comentado previamente, el tiempo de relajación T_1 representa la facilidad con la que los protones intercambian energía con el medio y la relajación T_2 es el resultado de las interacciones entre los espines (Berendsen, 1992).

En las distribuciones de los tiempos de relajación, principalmente se visualiza la contribución de los protones de las moléculas móviles, que en el caso de los alimentos proceden del agua y de la grasa. El T_1 se ha relacionado más frecuentemente con la determinación de grasa y el T_2 con el estudio y caracterización de la distribución y la movilidad de agua, siendo éste el tiempo de relajación más estudiado en alimentos (Bertram & Andersen, 2006). De hecho, se ha propuesto que la relajación en alimentos es multiexponencial, siendo posible diferenciar y caracterizar distintas poblaciones de agua en función de su propio tiempo de relajación. Los T_2 característicos reflejan la movilidad del agua presente en cada población, de manera que, las moléculas de agua muy móvil (libre) relajarán muy lentamente y tendrán T_2 largos, mientras las moléculas

menos móviles, con mayor grado de inmovilización o ligazón, tendrán T_2 cortos. A modo de ejemplo, en la Figura I.10 se muestran las curvas de relaxometría que representan los cambios en las componentes T_{2a} (relajación rápida) y T_{2b} (relajación lenta) en muestras de queso manchego analizadas a distintos tiempos de maduración (Cruz *et al.*, 2014).

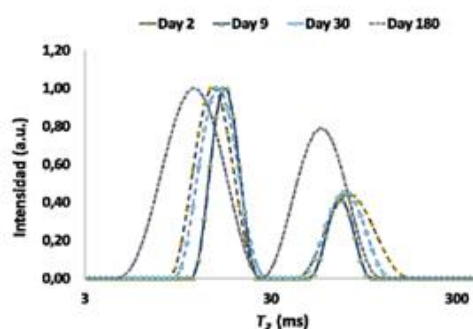


Figura I.10. Curvas de relaxometría registradas en un equipo de 200 MHz, a partir de muestras obtenidas a diferentes tiempos de maduración durante el proceso de elaboración de queso manchego (Cruz *et al.*, 2014).

Para obtener los tiempos de relajación T_2 se pueden utilizar distintas secuencias de pulsos de radiofrecuencia, aunque la más empleada es la secuencia Carl-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (Carr & Purcell, 1954; Meiboom & Gill, 1958). En la secuencia CPMG se aplica un pulso inicial de 90° seguido de una serie de pulsos de 180° . Para cada pulso de 180° se obtiene un eco y la relajación se puede representar como la amplitud del eco en función del tiempo (Figura I.11).

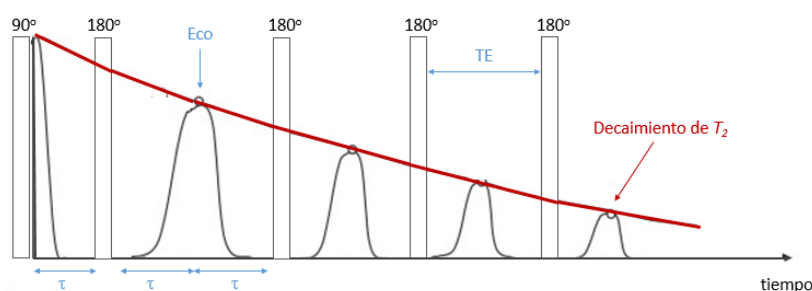


Figura I.11. Representación de la secuencia CPMG. TE: tiempo de eco. τ : tiempo transcurrido entre el pulso de 90° y el de 180° ($\tau = TE/2$).

Existe una relación de dependencia entre los tiempos de relajación y el campo magnético empleado en el estudio, de manera que la intensidad del campo influye sobre el perfil de las distribuciones obtenidas. Es posible obtener las constantes de relajación,

T₁ y T₂, características de un tejido trabajando a bajo campo, entre 0,5 y 1,5 Teslas, [RMN de bajo campo o *low-field NMR* (LF-NMR)], o trabajando a campo alto [RMN de alto campo o *high-field NMR* (HF-NMR)], con equipos de intensidad de campo magnético superior a 1,5 Teslas.

La relaxometría es un método rápido, no destructivo y altamente sensible a la movilidad a nivel molecular, con el que se puede obtener información macro y micromolecular de una matriz alimentaria a través del estudio de la movilidad y distribución del agua (Pearce, 2011). Además, a través de las distribuciones de los tiempos de relajación, es posible investigar cómo procesos de transformación y conservación, así como la presencia de ciertos componentes o la adición de aditivos, afectan a la disponibilidad del agua en los alimentos. Es una técnica única para estudiar la calidad y transformación de la carne, ya que proporciona información directa sobre las propiedades físicas (distribución, compartimentación) y químicas (movilidad, interacción entre macromoléculas) del agua (Bertram & Andersen, 2004).

I.1.3.3. Espectroscopía de RMN

A diferencia de la imagen de RMN y la relaxometría, que se centran más en propiedades estructurales de la muestra, la espectroscopia de RMN se emplea mayoritariamente para identificar los metabolitos presentes en las muestras. La espectroscopía de RMN permite diferenciar núcleos en distintos entornos químicos, en función de su frecuencia de resonancia.

Previamente, se ha descrito el concepto de resonancia de un núcleo aislado dentro de un campo magnético, pero en realidad los núcleos no se encuentran aislados. La frecuencia de resonancia exacta de un tipo de núcleo determinado depende en una forma característica de su entorno. El resultado de este hecho es que el campo magnético que generalmente llega al núcleo es más débil que el campo externo, por tanto, se dice que el núcleo está protegido o apantallado. Este **apantallamiento** es muy importante desde el punto de vista experimental ya que el campo magnético efectivo que siente un protón dentro de una molécula es generalmente menor que el campo externo, y por lo tanto, para que el núcleo entre en resonancia a campo B₀ constante, la

frecuencia disminuirá al aumentar el apantallamiento. El pulso de RF aportará una banda de frecuencias para que todos los núcleos entren en resonancia.

El resultado es un espectro de diversas frecuencias donde cada conjunto de núcleos específicos da origen a una señal única de RMN. Así pues, un espectro de RMN es una representación de la intensidad de señal en función de la frecuencia de la energía electromagnética que liberan los diversos núcleos de una muestra. Para la determinación de la posición de la señal en el espectro, se define el **desplazamiento químico** (δ) que es una magnitud adimensional, característica del núcleo considerado y su entorno y es independiente de la frecuencia de medida y de la intensidad de campo magnético (Figura I.12).

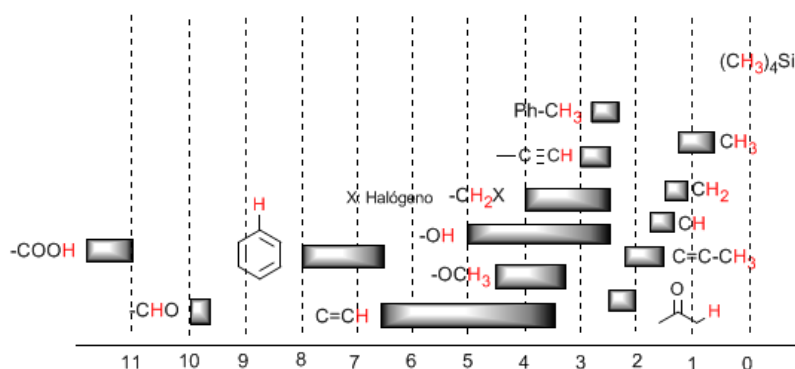


Figura I.12. Rangos de desplazamiento químico (ppm) para diferentes tipos de ^1H , según su entorno químico.

En consecuencia, en un espectro 1D es posible observar distintas señales de resonancia correspondientes a los núcleos presentes en la muestra analizada. El estudio detallado del espectro aporta valiosa información sobre la naturaleza química de las moléculas en estudio. Los desplazamientos químicos muestran la posición de los núcleos en el espectro y proporcionan información sobre el entorno químico de la muestra, lo que permite identificar los diferentes metabolitos presentes. Adicionalmente, el área que comprende cada señal (integral) es proporcional a la abundancia relativa de los núcleos que la producen y, por tanto, aporta información acerca de la concentración.

La información que contiene un espectro de RMN es bastante completa, lo que permite con frecuencia la elucidación de manera directa de la estructura de

determinadas moléculas sencillas y/o de tamaño intermedio, como se observa en la Figura I.13 para el espectro ^1H RMN de la molécula de quinina.

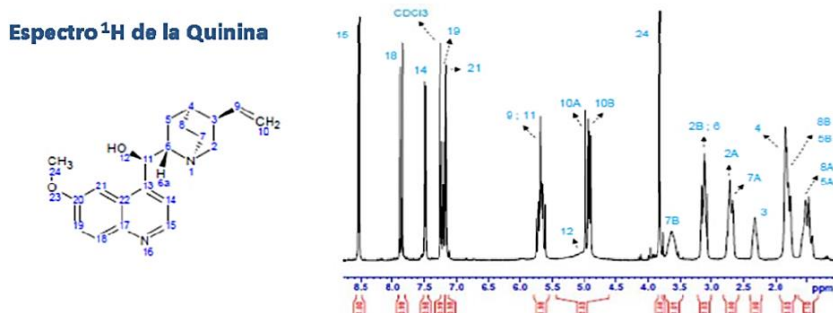


Figura I.13. Espectro ^1H RMN de la quinina, alcaloide natural que se utiliza con frecuencia como muestra patrón en RMN.

La información contenida en un espectro 1D es bastante completa y suele permitir la elucidación directa de la estructura de las moléculas, que generalmente ya se encuentra tabulada. Pero en muestras complejas, dada la concentración de señales y su solapamiento, no es tan fácil extraer la información espectral (Figura I.14). En este contexto, la espectroscopía 2D surge para solucionar la falta de resolución espectral en los experimentos 1D complejos proporcionando información complementaria que permitirá llevar a cabo la elucidación estructural.

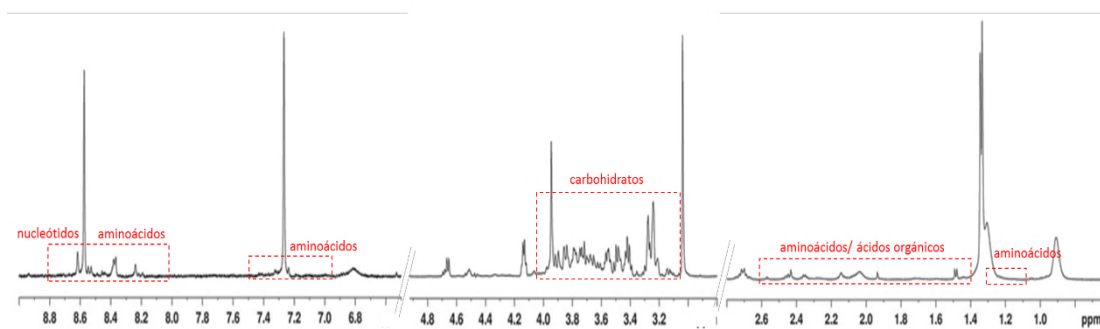


Figura I.14. Espectro ^1H 1D de carne picada de cerdo en el que se representa la localización de los principales grupos funcionales.

En la RMN 2D, los datos adquiridos dependen de dos variables de tiempo diferentes. La primera continúa siendo el tiempo t_2 , que es el tiempo de detección habitual en los experimentos de RMN 1D. La segunda es una nueva variable temporal, t_1 , *tiempo de evolución*. Los experimentos 2D se basan, por tanto, en la adquisición de experimentos

1D sucesivos en los que t_1 es incrementado de manera secuencial en cada uno de ellos. La FID obtenida dependerá de dos variables temporales $f(t_1, t_2)$ que, tras la aplicación de la transformada de Fourier dará lugar a un espectro bidimensional en función de dos variables en el dominio de las frecuencias $f(\nu_1, \nu_2)$ (Figura I.15).

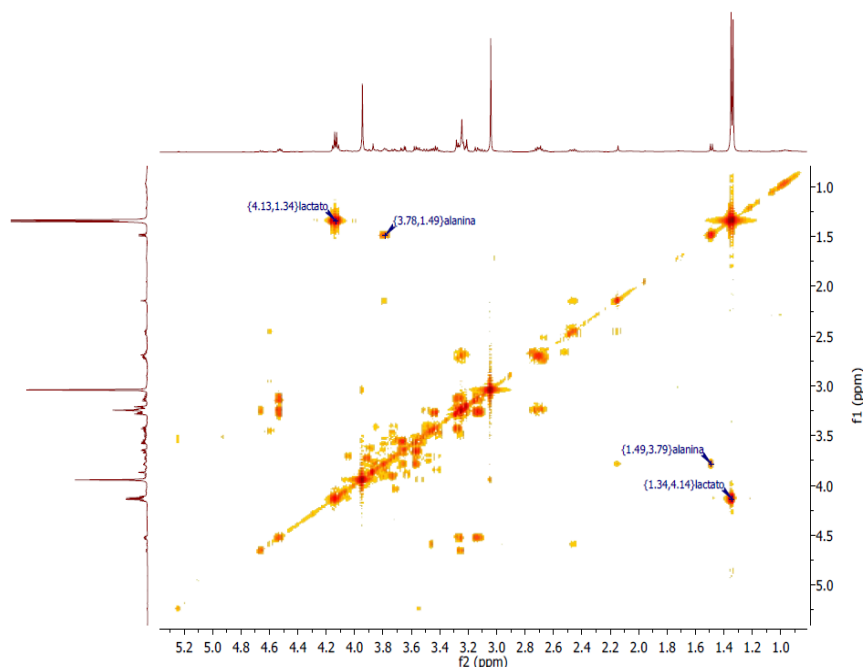


Figura I.15. Espectro bidimensional ^1H - ^1H -COSY de exudado de carne de ternera tratada con 8kGy.

En función de la información que se quiera obtener se podrá seleccionar el experimento 2D necesario. Los experimentos 2D se clasifican en homonucleares y heteronucleares. Los experimentos 2D homonucleares más empleados son:

- ^1H , ^1H -COSY (*CORrelated SpectroscopY*): Proporcionan valiosa información sobre los acoplamientos escalares ^1H - ^1H (geminales y vecinales). Establece, principalmente, las relaciones de vecindad entre los núcleos de hidrógeno de la molécula (situados a 3 enlaces).
- ^1H , ^1H -TOCSY (*TOTAL CORrelated SpectroscopY*). Reflejan los acoplamientos entre núcleos de ^1H , pertenecientes al mismo sistema de espines, que se encuentran a una distancia entre 2 y 5 enlaces entre ellos. Se consigue así disponer de una información bastante completa sobre la vecindad de núcleos de ^1H . Cada una de las correlaciones obtenidas en el espectro 2D

correlacionan a los núcleos de ^1H , que se encuentran acoplados entre sí a través de los enlaces (correlación escalar).

- $^1\text{H},^1\text{H}$ -NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*). Permite la obtención de información espacial entre los núcleos de ^1H . Las señales de cruce o correlaciones que aparecen en este experimento bidimensional reflejan la existencia de interacciones a través del espacio (acoplamientos dipolares) entre los núcleos de ^1H .

Además del ^1H , en las muestras es posible obtener información sobre otros núcleos de interés (heteronúcleos) como el ^{13}C , ^{15}N o ^{31}P que, en combinación con el ^1H pueden aportar nueva información estructural y contribuir a la elucidación estructural de la muestra. Los experimentos 2D de correlación heteronuclear más habituales son:

- $^1\text{H},\text{X}$ -HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) o $^1\text{H},\text{X}$ -HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*), que muestran las correlaciones escalares entre los núcleos de hidrógeno y los heteronúcleos a los que se encuentran directamente unidos.
- $^1\text{H},\text{X}$ -HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), que proporcionan las correlaciones entre los núcleos de hidrógeno y los heteronúcleos X con los que se acoplan escalaramente a dos o tres enlaces de distancia.

I.1.3.3.1. Análisis de muestras mediante ^1H RMN

Como se ha comentado previamente, por las características del análisis, la espectroscopía de RMN se ha utilizado ampliamente para el estudio de alimentos (Ramakrishnan & Luthria, 2017), siendo posible el análisis de distintos tipos de muestras (Figura I.16):

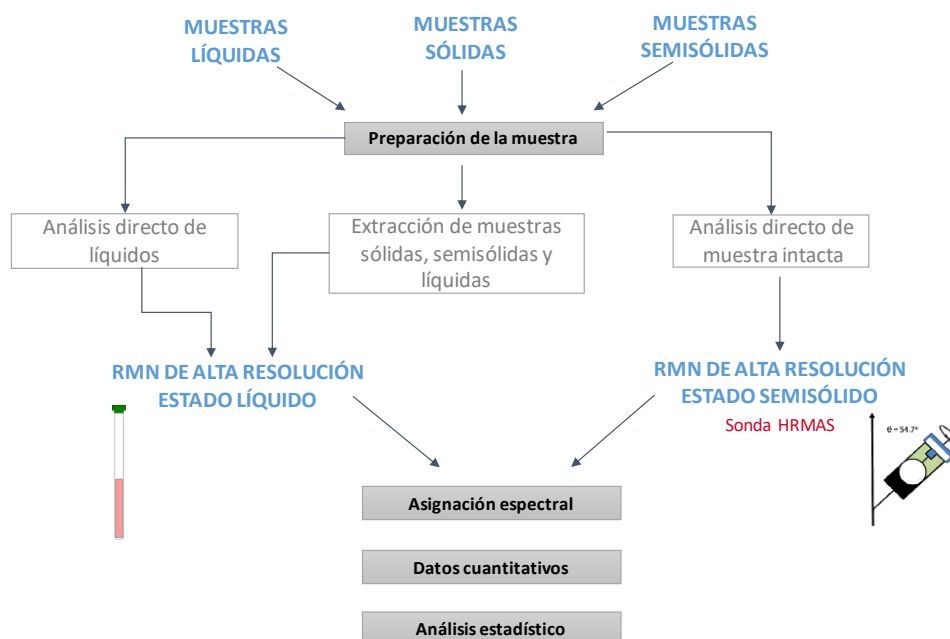


Figura I.16. Representación esquemática del análisis de muestras mediante RMN.

- **Análisis de muestras en disolución:** esta es la modalidad de la RMN más convencional. Se puede aplicar a cualquier tipo de muestra e incluye el estudio de:
 - Muestras líquidas: se incluyen aquí muestras alimentarias líquidas que se analizan, bien sin ningún pretratamiento (como los zumos de frutas o los aceites vegetales) o bien con pretratamientos simples, como liofilización y posterior disolución del liofilizado (vino) o disolución previa de muestras viscosas (miel).
 - Muestras sólidas: en este grupo se incluyen muestras de naturaleza tisular, cuyo análisis como muestra en disolución, requerirá un paso previo de extracción de compuestos. El análisis de estas muestras sólidas generalmente lleva asociado un paso previo de homogeneización anterior a la extracción.
- **Muestras sólidas:** en estado sólido, la movilidad de los átomos y moléculas se encuentra muy restringido, por lo que, a diferencia de los espectros que se registran para moléculas en disolución, los espectros que se obtienen con muestras sólidas presentan señales ensanchadas que son el resultado de la

suma de las señales procedentes de todas las posibles orientaciones espaciales de los espines. A pesar de todo, los espectros de RMN en fase sólida proporcionan una información única acerca de la estructura y la dinámica de los materiales objeto de estudio. Las principales interacciones responsables del ensanchamiento de las señales son la anisotropía del desplazamiento químico, los acoplamientos dipolares y el acoplamiento cuadrupolar. Se han desarrollado técnicas que reducen estas interacciones y que permiten obtener espectros de alta resolución conservando, en lo posible, la información que aportan estas interacciones: giro con ángulo mágico (que se desarrollará más adelante), polarización cruzada o secuencias multipulsos específicas para sólidos.

- **Muestras semisólidas:** en este grupo se incluyen matrices de naturaleza compleja, ni sólida, ni líquida, normalmente con una organización firme, pero con cierta capacidad para fluir. La técnica que permite el estudio de muestras semisólidas por RMN es conocida como HRMAS por sus siglas en inglés, *High Resolution Magic Angle Spinning*. El empleo de una sonda con giro con ángulo mágico (inclinación de $54,7^\circ$ con respecto al campo externo B_0) (Figura I.17), combinado con la tecnología de alta resolución de RMN empleada en el análisis de muestras líquidas, permite obtener espectros de alta resolución de matrices heterogéneas que no se pueden clasificar como sólidas ni como líquidas, son sistemas semisólidos. Una de las innovaciones de la técnica viene dada por la posición del ángulo mágico junto con la alta velocidad de giro de la muestra (4-6 kHz), lo que permite reducir los efectos de la anchura de línea típicos de muestras sólidas causados por la heterogeneidad de la muestra y las interacciones anisotrópicas. La metodología de HRMAS permite analizar directamente, sin manipulación, una muestra de tejido/alimento intacto. Se consigue así la identificación simultánea de metabolitos polares y apolares presentes en la muestra y, por tanto, la caracterización completa de todo su contenido metabólico, evitando largos tiempos de manipulación y la posible alteración de la muestra.

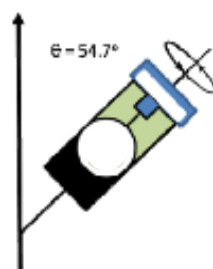


Figura I.17. Esquema de un rotor de HRMAS girando con ángulo mágico.

En la preparación de muestras de RMN hay algunos aspectos que son importantes para obtener resultados reproducibles y sin variaciones indeseables entre las muestras analizadas que puedan dificultar la asignación de las señales de RMN y la comparación entre diferentes espectros. A continuación, se detallan los principales aspectos a considerar:

- **La variación de pH** entre las muestras acuosas puede causar una significativa diferencia en los desplazamientos químicos de las señales pertenecientes a los ácidos orgánicos, aminoácidos y a otros metabolitos con grupos funcionales ácidos o básicos. Las variaciones en el desplazamiento químico introducen cambios adicionales que pueden distorsionar los resultados. Para evitar este problema se pueden aplicar dos estrategias: por un lado, el control del pH mediante el empleo de disoluciones tampón y, por otro lado, la realización de un procesamiento específico de los datos, mediante la aplicación del *bucketing*, una opción muy empleada en el análisis multivariante, en la que los espectros se dividen en regiones espectrales cuidadosamente seleccionadas.
- **Disolvente deuterado:** la técnica de RMN en estado líquido requiere el empleo de un disolvente deuterado para corregir la variación en la frecuencia que se produce debido a la fluctuación del campo magnético. Además, sobre la señal del disolvente deuterado, se ajusta la homogeneidad del campo magnético y se obtienen así espectros con una alta resolución. Las muestras líquidas de alimentos pueden analizarse por RMN con la simple adición de una pequeña fracción de disolvente deuterado para ajustar la señal de RMN. En el caso de muestras viscosas o sólidas, éstas se disuelven directamente en el

disolvente deuterado. Los más comunes empleados en el análisis de alimentos por RMN son D_2O , metanol- d_4 , dimetilsulfóxido- d_6 (DMSO- d_6), acetona, acetonitrilo- d_3 y cloroformo- d .

- **Concentración y temperatura:** el efecto de la concentración sobre los desplazamientos químicos es otro aspecto que tiene que ser considerado en el análisis de los espectros de RMN y, en algunos casos, puede hacer que sea difícil la utilización de los valores de desplazamiento químico publicados, pertenecientes a los compuestos estándar de referencia para la identificación de metabolitos. De igual forma, es importante que todos los experimentos se lleven a cabo a la misma temperatura para evitar posibles variaciones del desplazamiento químico.
- **Estándares internos y agentes quelantes:** en muchos casos, hay que recurrir a la adición de un patrón interno al disolvente deuterado utilizado. Este producto se utiliza, fundamentalmente, como referencia de desplazamiento químico, pero su presencia también se puede aprovechar para obtener una cuantificación absoluta de los metabolitos presentes. En disoluciones acuosas se suele utilizar como estándar interno el 3-(trimetilsilil)propionato-2,2'-3,3'-sódico- d_4 (TSP) o el ácido 3,3-dimetil-2,2-silapentano-5-sulfónico (DSS), mientras que en muestras orgánicas el más utilizado es el tetrametilsilano (TMS). Las señales de RMN de algunos ácidos orgánicos (como el cítrico o el málico) procedentes de extractos derivados de plantas y productos alimentarios son generalmente anchas debido a que estos compuestos son capaces de formar complejos con cationes paramagnéticos (Fe^{3+} y Mn^{2+}). Este ensanchamiento se puede evitar mediante la adición a la muestra de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para capturar los iones paramagnéticos.

I.1.3.3.2. Análisis metabolómico

La metabolómica es una ciencia de reciente desarrollo que se define como el estudio sistemático de las *huellas* químicas únicas que dejan los diferentes procesos biológicos (Fiehn, 2001). Tiene como objetivo detectar, cuantificar y elucidar la estructura de los metabolitos, los cuales se caracterizan por una gran diversidad físico-química en sus

estructuras moleculares. La metabolómica se incluye dentro de las técnicas *ómicas*, un conjunto de recientes metodologías analíticas de alto rendimiento empleadas en diferentes disciplinas que permiten detectar a gran escala en cualquier sistema biológico los genes, proteínas y metabolitos (Figura I.18) con el fin de obtener una visión lo más completa posible del sistema en estudio.

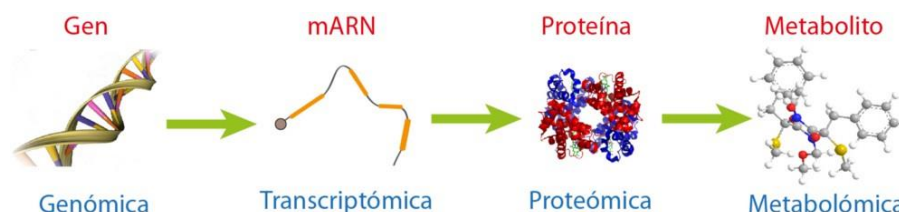


Figura I.18. Principales técnicas ómicas.

El estudio de los alimentos y su bioactividad mediante técnicas masivas de análisis (genómica, proteómica y metabolómica) se ha definido recientemente como foodómica o alimentómica (García-Cañas et al., 2012). Esta disciplina pretende profundizar en cómo los alimentos repercuten en la prevención o la evolución de las enfermedades. La metabolómica permite abordar de forma global estudios acerca de los aspectos esenciales de los alimentos como su seguridad, calidad y trazabilidad a partir de la detección de nuevos contaminantes, la determinación de modificaciones en alimentos transgénicos y la definición de nuevos biomarcadores de la calidad de los alimentos (Cifuentes, 2013).

La gran diversidad de metabolitos se refleja en una amplia gama de polaridades, pesos moleculares, grupos funcionales, estabilidad y reactividad química, entre otras propiedades. Esto requiere el uso de plataformas analíticas que maximicen la cobertura del metaboloma analizado. Las dos técnicas más empleadas para identificar y cuantificar metabolitos son: la RMN y la espectroscopía de masas (MS), esta última casi siempre acoplada a técnicas cromatográficas como la cromatografía líquida (LC-MS), la cromatografía de gases (GC-MS) o, en menor medida, la electroforesis capilar (CE-MS). La RMN presenta ciertas ventajas sobre la MS:

- No necesita la separación de los analitos, por lo que no requiere fraccionamiento/alteración de la muestra.

- Es una técnica no destructiva y no invasiva, por lo que es posible recuperar la muestra tras el análisis.
- Es universal, detecta todos los metabolitos a la vez, no es selectiva.
- Es una técnica altamente reproducible. Además, generalmente, la preparación de la muestra es sencilla.

Por otro lado, es menos sensible que la MS, cuyo límite de detección es sensiblemente menor.

Las principales etapas de un análisis metabolómico se recogen en la Figura I.19.

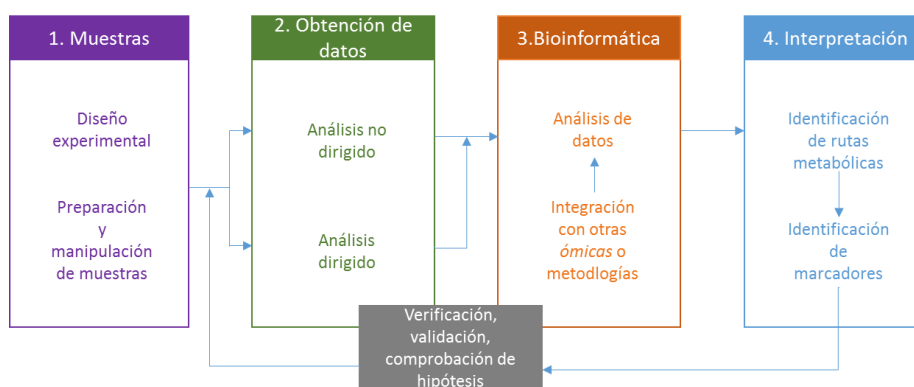


Figura I.19. Principales etapas en un estudio metabolómico.

En función del conocimiento previo disponible acerca del problema biológico/bioquímico y de la información que se quiera obtener del estudio, se seleccionará el tipo de análisis metabolómico más apropiado. En aquellos casos en los que se conozca el número y tipo de metabolitos de interés, se puede realizar una **aproximación dirigida (Targeted)**. Por el contrario, en los casos en los que no se tenga información previa de los metabolitos que puedan estar implicados en el proceso estudiado, se llevarán a cabo **aproximaciones no-dirigidas (Untargeted)** (Fiehn, 2002; Laghi *et al.*, 2014). El primero de ellos es un análisis diana restringido al estudio de un número limitado de metabolitos seleccionados en función de conocimientos previos a la realización del estudio metabolómico y constituye una de las aproximaciones analíticas más empleadas en metabolómica. Por tanto, en este tipo de análisis se puede particularizar el tratamiento de una muestra y utilizar la técnica de medida más

conveniente para identificar y cuantificar los compuestos seleccionados en el estudio (Mannina *et al.*, 2009). En el análisis no dirigido, se pretende determinar simultáneamente tantos metabolitos como sea posible para obtener una visión global del problema de interés. Dado que para la aproximación no dirigida no se posee información de antemano del problema que se plantea, en este caso es particularmente importante desarrollar un estudio experimental muy detallado para poder detectar el máximo número posible de metabolitos sin introducir ningún sesgo debido a las condiciones experimentales o de medida de las muestras (Tautenhahn *et al.*, 2012).

I.1.3.3.3. Procesado y análisis de los datos espectrales

La señal obtenida mediante RMN (FID) no es directamente utilizable por las herramientas bioinformáticas necesarias para realizar el análisis de datos, por tanto, es necesario realizar una serie de operaciones básicas, denominadas habitualmente pre-procesado de datos. Las etapas habituales que comprende el pre-procesado se muestran en la Figura I.20.

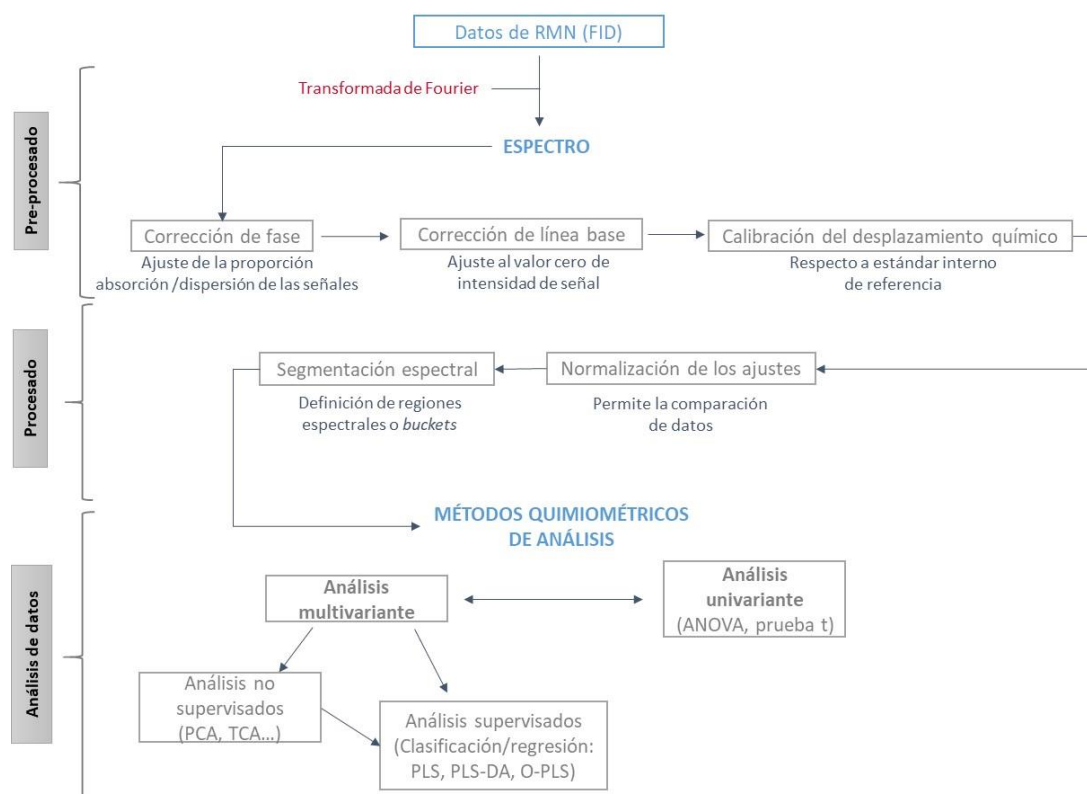


Figura I.20. Etapas del pre-procesado de datos de RMN y principales métodos quimiométricos de análisis.

El procesado de los datos espectrales suele requerir además de una metodología estadística característica. En un análisis metabolómico habitualmente se maneja un volumen muy grande de muestras y variables y, normalmente, se requiere un proceso de reducción de su dimensionalidad. Se utiliza para ello la quimiometría, conjunto de herramientas matemáticas y estadísticas que permiten extraer la información relevante de los datos producidos en experimentos químicos (Lavine & Workman, 2004). Los métodos de análisis se pueden clasificar como **univariantes**, que utilizan información de cada variable o metabolito, o **multivariantes**, que emplean de forma conjunta la información de las múltiples variables presentes (Figura I.20). Los métodos de análisis multivariante pueden ser además **no supervisados**, que permiten evaluar la variabilidad de los datos sin tener en cuenta su clasificación dentro de ningún grupo, o **supervisados**, que utilizan la información sobre la clasificación de las muestras para maximizar la separación entre grupos.

Análisis univariante: una vez que se conoce la distribución y la homogeneidad de las variables en los grupos de muestras, se puede seleccionar el método de análisis de la varianza más adecuado. El análisis de la varianza es una prueba estadística univariante que tiene como objetivo principal la detección de metabolitos significativamente diferentes entre los grupos considerando, en general, un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. El análisis univariante puede servir para la selección/reducción de variables antes del análisis multivariante o, también, una vez identificadas las señales más relevantes que permiten la discriminación entre los grupos estudiados mediante el análisis multivariante.

Análisis multivariantes no supervisados de exploración: como se mencionó previamente, los métodos no supervisados no tienen en cuenta la información de la pertenencia de las muestras a los grupos de clasificación. Estos métodos son de gran utilidad para la identificación de patrones y/o tendencias dentro de las muestras estudiadas. En muchos casos, los resultados obtenidos en esta etapa son suficientes para distinguir las variaciones entre los grupos en función de sus diferencias metabólicas. Además, permiten la identificación de muestras atípicas que se desvían significativamente del perfil global que muestran los grupos analizados. La eliminación

de dichas muestras es el punto de partida de todo análisis estadístico y, por tanto, es un paso fundamental y previo a la aplicación de un análisis supervisado.

Una de las metodologías más utilizada en el análisis metabolómico es el análisis multivariante mediante PCA (*Principal Component Analysis*) ya que permite representar los datos espectrales en un espacio de baja dimensionalidad. Como resultado de este análisis, los datos extraídos de una matriz (X) con k dimensiones, donde k corresponde al número de variables, son reducidos a un espacio definido por unos pocos componentes principales (PCs), capaces de explicar la mayor variabilidad entre las muestras. El primer componente principal (PC1) consistirá en una combinación lineal de todas las variables espaciales ponderadas para explicar el máximo de la varianza total del espacio original; el segundo componente principal (PC2) será ortogonal al primero y explicará el máximo de la varianza residual, y así con el resto hasta que la varianza total quede explicada. Como los PCs son ortogonales entre sí, la representación gráfica de los datos en el espacio bidimensional definido por dos PCs (p. ej., PC1 *versus* PC2), proporciona una proyección que se conoce como gráfico de puntuaciones de las muestras o *score plot*, donde cada uno de los puntos representa el espectro de una muestra. En el gráfico de puntuaciones, se pueden apreciar las principales agrupaciones y tendencias entre las muestras analizadas. De manera análoga, el gráfico de puntuaciones de las variables o *loading plot*, define las relaciones entre las k variables que integran la matriz de datos original (X), lo que permite identificar, de forma gráfica, cuáles son las variables (*buckets*) responsables de las tendencias o agrupaciones observadas.

La Figura I.21 muestra los gráficos de *score plot* y *loading plot* de un análisis de PCA de los espectros de ^1H RMN de muestras de exudado de merluza almacenada en hielo entre 1 y 12 días. El análisis por PCA permite agrupar las muestras en función del tiempo de almacenamiento e indicar los *buckets* más significativos en dicha agrupación (Castejón et al., 2015).

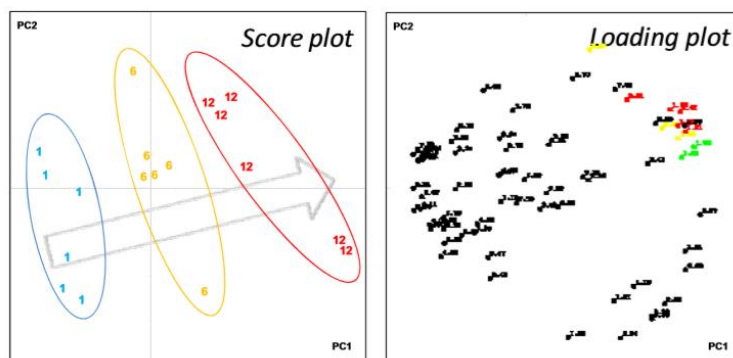


Figura I.21. Diagramas de scores y de loadings de un análisis de PCA (Castejón et al., 2015).

Análisis multivariantes supervisados: el objetivo de estas técnicas es obtener funciones de clasificación a partir de la información proporcionada por las variables analizadas en las muestras pertenecientes a los diferentes grupos que forman el llamado *conjunto de entrenamiento o training data set*. Este conjunto de muestras se puede utilizar para confirmar que existe diferencia entre los grupos de clasificación y también para rediseñar la clasificación de *muestras ciegas o test data set*. En espectroscopía, donde el número de variables suele ser más grande que el número de muestras es común recurrir al empleo de la regresión lineal.

La regresión de mínimos cuadrados o *Partial least squares regression (PLS regression)* es un método estadístico que estudia la relación entre dos matrices de datos, X e Y, en donde la matriz X contiene los datos extraídos de los espectros de RMN para cada muestra, mientras que la matriz Y contiene información adicional sobre los tipos de muestra analizada (clase, género, tratamiento de la muestra, etc.). Estos métodos utilizan el conocimiento previo de las muestras para construir modelos estadísticos robustos que permitan, posteriormente, predecir la clase a la pertenece una muestra determinada sin necesidad de estar previamente clasificada. La representación gráfica de estos modelos, de manera similar al PCA, revela el grado de discriminación entre los grupos. Las técnicas quimiométricas supervisadas se han utilizado ampliamente en muestras alimentarias para hacer frente a problemas relacionados con la autenticación de origen o variedad y así poder clasificar y/o discriminar entre diferentes tipos de muestras (Schievano et al., 2008; Capitani et al., 2010).

La Figura I.22 muestra un ejemplo donde se describe el estudio de muestras de suero procedentes de vacas sanas y enfermas (Zhang et al., 2015). Existe una agrupación mediante los dos métodos de análisis multivariante empleados (no supervisado, PCA, y supervisado, PLS), aunque el método supervisado, como era de esperar, amplifica las diferencias y permite obtener una mejor clasificación de las muestras.

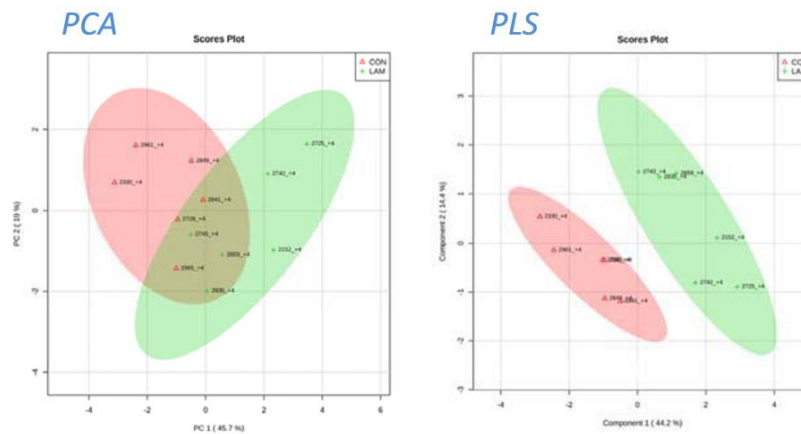


Figura I.22. Análisis de PCA y PLS de muestras de suero procedentes de vacas sanas (rojo) y vacas enfermas (verde) (Zhang et al., 2015)

I.2. EL SECTOR CÁRNICO ESPAÑOL

Basta una rápida radiografía del sector cárnico español para dar una idea de su relevancia económica, social, industrial y comercial, como motor de la cadena de valor de la carne, singularmente de la de porcino. De aquí la importancia de que este sector industrial cuente con el respaldo y el apoyo científico-técnico de los centros de investigación y universitarios, facilitando la puesta en el mercado productos cada vez más seguros, saludables y apreciados y, en definitiva, incrementando su competitividad y cuota de mercado.

I.2.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA INDUSTRIA CÁRNICA ESPAÑOLA

La industria cárnica es el cuarto sector productivo de nuestro país, sólo por detrás de parcelas tan relevantes como la industria automovilística, la del petróleo y combustibles y la de producción y distribución energética. El sector cárnico, formado por mataderos, salas de despiece e industrias de elaborados, presenta en nuestro país un tejido industrial constituido por unas 3.000 empresas, la mayoría en la categoría de pequeñas y medianas, repartidas por toda la geografía nacional (ANICE, 2015). El 75% de las industrias cárnicas españolas tienen menos de 20 empleados, según el Instituto Nacional de Empleo (INE). Aunque su estructura está muy diseminada, la industria cárnica ocupa con diferencia el primer lugar de toda la industria española de alimentos y bebidas, representando una cifra de negocio de 22.000 millones de euros, más del 21% de todo el sector alimentario, según datos publicados por el Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA, 2016a). Esta cifra de negocio supone aproximadamente el 2 % del PIB total español, y en concreto el 14% del PIB de la rama industrial. El empleo sectorial directo de las empresas cárnicas supera los 80.900 trabajadores, equivalente a más del 20% de la ocupación total de la industria alimentaria española.

Por otra parte, la industria cárnica contribuye a paliar el déficit comercial de nuestro país. Se trata del primer subsector exportador de la parcela agroalimentaria. En los últimos años, se exportaron en torno a 1,7 millones de toneladas de productos frescos y alrededor de 148.552 Tm de elaborados cárnicos, con un valor de más de 4.467

millones de euros a distintos países del mundo, con una balanza comercial muy positiva y en constante progresión, que ha pasado de una tasa de cobertura del 229% en 2010 al 375% en 2015. La industria cárnica es, por tanto, un sector estratégico que es necesario proteger para conservar su posicionamiento internacional y su carácter competitivo.

Como es sabido, España es uno de los países con mayor tradición en la elaboración y consumo de una amplia gama de productos cárnicos, que engloba una extensa variedad de embutidos y jamones, que forman parte del acervo cultural y gastronómico de cada una de sus comunidades o regiones. Las extraordinarias características organolépticas de estos productos cárnicos son la base de su gran aceptación tanto a nivel nacional como internacional. El mercado actual, se caracteriza por la comercialización de productos tradicionales de calidad, bien caracterizados y diferenciados, que conviven con nuevos derivados cárnicos con los que se intenta cubrir las demandas del consumidor actual y los requerimientos de su forma de vida. En el amplio elenco de derivados cárnicos, sin duda, el producto más emblemático es el jamón curado, seguido de otros productos entre los que cabe citar, lomo embuchado y embutidos curados como chorizo, salchichón, fuet y salami además de fiambres y jamón cocido, galantinas, bacon, morcillas, salchichas y elaborados para untar, como patés y sobrasadas. En los últimos años, se ha modificado la forma de comercializar estos derivados cárnicos. Mientras se ha reducido la venta de piezas enteras o troceadas en porciones, más o menos grandes, se ha incrementado la oferta de productos loncheados listos para su consumo o envasados en porciones pequeñas adaptadas al consumo individual o en unidades familiares. Por otra parte, la industria cárnica está elaborando productos con menor aporte calórico y con perfiles más saludables, adaptándose a los nuevos criterios nutricionales.

Otros cambios experimentados en el sector cárnico hacen referencia a la distribución de los productos. En los últimos años, se ha experimentado un claro retroceso de las ventas en charcuterías y otros establecimientos especializados, frente al avance de la distribución en el libre servicio. La gran distribución organizada, como en el resto de segmentos de consumo, ha ido captando cuota de mercado en todos los productos

cárnicos, sobre todo por conveniencia de precio y comodidad. No obstante, las características especiales de la carne fresca y de sus derivados hacen que haya una porción importante del mercado dedicada a un comercio especializado cada vez más modernizado y profesional.

I.2.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA DE LA CARNE DE CERDO Y SUS DERIVADOS CÁRNICOS

El sector porcino español tiene una importancia clave en la economía de nuestro país ya que supone el 12,7% de la Producción Final Agraria. Dentro de las producciones ganaderas, que representan en torno al 38% de la Producción Final Agraria, el sector porcino ocupa el primer lugar en cuanto a su importancia económica alcanzando el 36,4% del total.

A nivel mundial, la UE-28 es el segundo productor de carne de porcino, después de China. Individualmente, España es la cuarta potencia productora (después de China, EEUU, y Alemania), mientras que, a nivel europeo, ocupa la segunda posición, aportando el 17,5% de las toneladas producidas (MAPAMA, 2016a), por detrás de Alemania, y es el primer país de la UE en censo, con más del 19% (Figura I.23) del ganado porcino comunitario).

CENSO DE GANADO PORCINO EN LA UNIÓN EUROPEA
(Miles de animales en diciembre de 2015)

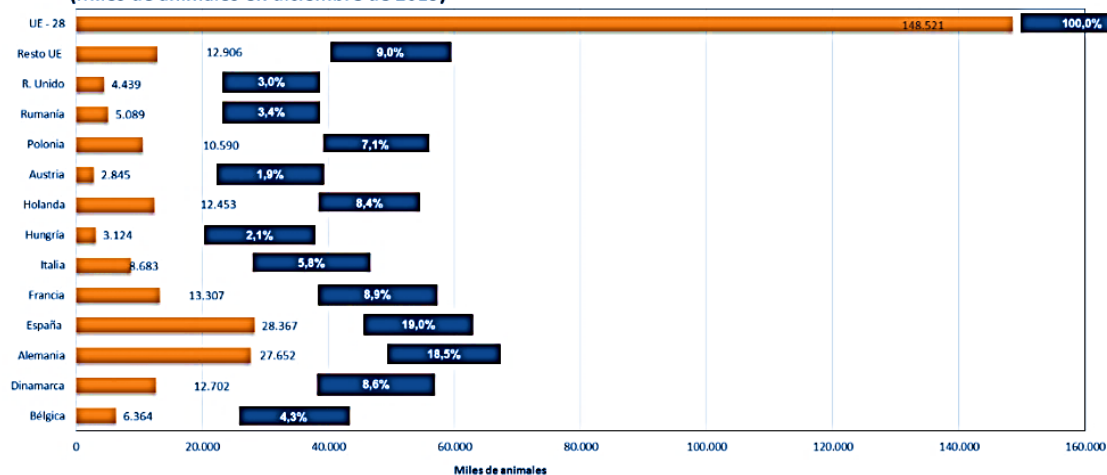


Figura I.23. Censo de animales porcinos en la Unión Europea (MAPAMA, 2016a).

Tras varios años de evolución irregular del censo de porcino, como consecuencia de las nuevas exigencias en materia de bienestar animal y de los vaivenes en los costes de

alimentación, desde noviembre de 2013 se ha consolidado en España una tendencia ascendente en relación con los efectivos porcinos. Los datos de noviembre de 2014 apuntaban a un aumento del censo total (+ 4,1%) y de las reproductoras (+ 4,7%) en particular, con respecto a las cifras de noviembre del año anterior. En 2015, se alcanzó un censo de 28,3 millones de individuos, lo que sitúa a España por primera vez como el país con mayor censo de la UE (Figura I.24) por delante de Alemania (27,5 millones). El número de animales sacrificados en 2015 se sitúa en 46,38 millones de cabezas, lo que supone una producción de 3.895.800 toneladas (MAPAMA, 2016a). En este año continúa la tendencia ascendente detectada los dos años precedentes, alcanzando cifras récord (Figura I.24).

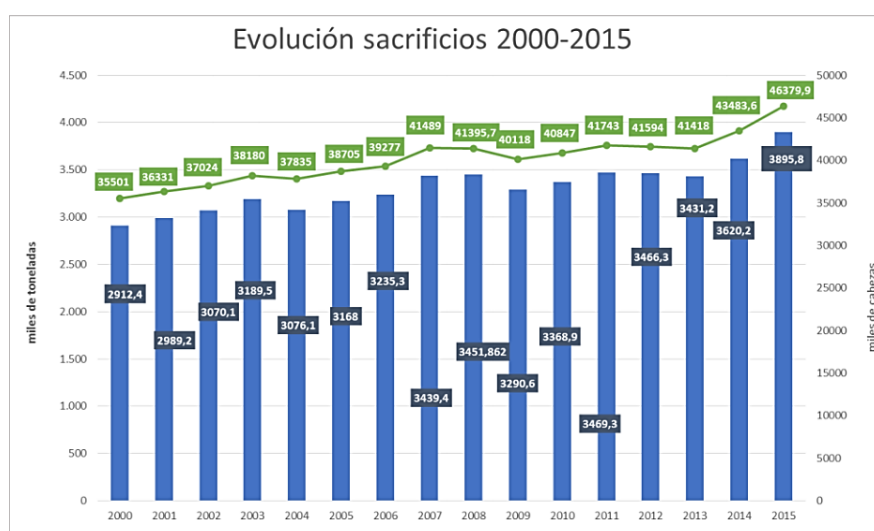


Figura I.24. Evolución del número de animales sacrificados 2000-2015 (MAPAMA, 2016a).

Este aumento de la producción ha incrementado la ya elevada tasa de autoabastecimiento, lo que convierte a la exportación en un elemento esencial para el equilibrio del mercado. Con una balanza comercial muy positiva, España se ha consolidado como segundo mayor exportador de porcino de la UE, sólo por detrás de Alemania. Cabe destacar en los últimos años el fuerte aumento de las exportaciones a terceros países, especialmente a China, que se ha convertido en el primer destino de la carne de porcino español. En el contexto internacional, la UE representa la principal potencia exportadora.

Por otro lado, España es uno de los países con mayor tradición en la elaboración y consumo de derivados cárnicos. Lo diverso de la producción chacinera forma parte de nuestro acervo cultural y gastronómico y es apreciada dentro y fuera de nuestras fronteras.

En cuanto a la producción de derivados cárnicos, España, con 1,3 millones de toneladas anuales, se sitúa en cuarto lugar en la UE, por detrás de Alemania, Italia y Francia. Por productos, destacan en volumen los fiambres cocidos, con un 28,6% de la cuota, y en valor, los jamones y paletas curados (blancos e ibéricos), con un 38,0% de participación (MAPAMA, 2016b) (Figura I.25).

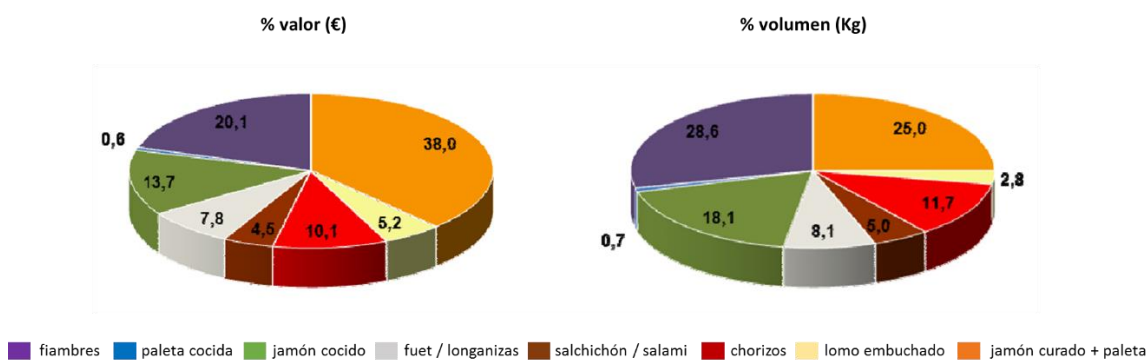


Figura I.25. Importancia de los tipos de carne procesada sobre el total de carne procesada (MAPAMA, 2016b).

En España, el consumo per cápita de carne procesada durante el año 2015 fue de 8,25 kilos por persona y año. El 28,6% corresponde a fiambres siendo la ingesta media aproximada de 2,36 kilos/persona/año. Le sigue el jamón curado y la paleta con un consumo per cápita de 2,06 kilos/persona/año (MAPAMA, 2016b).

La importancia que tiene en España el consumo de derivados cárnicos ejerce una gran influencia en todo el sector productivo y condiciona la mayor parte de las decisiones técnicas y económicas. La producción de derivados cárnicos exige una materia prima con atributos de alta calidad y características diferentes a las que requiere la comercialización de la carne fresca, de ahí la necesidad de introducir mejoras en los métodos de control y aseguramiento de la calidad, así como en los métodos y líneas de producción.

I.3. EL CERDO

La carne de cerdo proveniente de una buena crianza constituye un alimento nutritivo, saludable, sabroso, muy equilibrado en su composición y por su relación calidad-precio constituye uno de los productos cárnicos más consumidos por la población. Estructuralmente, se considera un miosistema, por la importancia que tienen las proteínas miofibrilares en la formación y consolidación de esta matriz cárnica. En este apartado se abordan consideraciones generales de la carne y se detallan aspectos relevantes relacionados con la estructura y composición de la misma.

I.3.1. CONSIDERACIONES GENERALES

El cerdo (*Sus scrofa domestica*) es un mamífero artiodáctilo (orden *Artiodactyla*) de la familia *Suidae*. Es un animal doméstico usado en la alimentación humana por algunas culturas, en especial las occidentales. El ancestro étnico de la mayoría de las razas de cerdos domésticos es el *jabalí eurasiático*, que fue domesticado de manera independiente en varios lugares distanciados, tanto geográfica como temporalmente (Larson *et al.*, 2005). Al ser animales adaptados a climas templados y semitropicales se pueden encontrar en muchas zonas del globo, hasta el punto de que a comienzos del presente siglo su población mundial se calculaba en más de 900 millones de ejemplares.

Los esfuerzos encaminados a fijar las características deseadas de razas mejoradas han conducido al reconocimiento de alrededor de 90 razas, con más de 200 variedades que se han agrupado en tres tipos principales de cerdos: el céltico, el ibérico y el asiático. Entre estos, la agrupación racial “tronco ibérico” con varias estirpes es la variedad genuina de España (Suárez *et al.*, 2002).

La tendencia actual presentada por la producción porcina en nuestro país viene marcada por las exigencias de la industria cárnica de transformación, particularmente las interesadas en la elaboración de productos de calidad, como el jamón o los embutidos curados. Bajo este planteamiento muchas de las razas porcinas locales o rústicas, anteriormente comercializadas, se encuentran en regresión debido fundamentalmente a su baja tasa de producción, a que ofrecen canales de tamaño reducido y bastante engrasadas, y/o por no responder a las demandas actuales del

mercado. En consecuencia, la producción y comercialización del ganado porcino ha experimentado un cambio profundo en nuestro país por la preferencia hacia otras razas foráneas mejoradas, como se indica en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España, recogido en el Anexo I del Real Decreto 2129/2008, de 26 de diciembre, por el que se establece el Programa Nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas, donde figuran como razas porcinas integradas en España: *Blanco belga, Duroc, Hampshire, Landrace, Large White y Pietrain*. Sin embargo, existen ejemplos de algunas razas porcinas históricas que han permanecido en el mercado nacional, al resultar altamente valoradas por la calidad aportada a sus productos derivados, particularmente los curados. Este es el caso del *Cerdo ibérico*.

I.3.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA CARNE DE CERDO

La carne es fundamentalmente tejido muscular acompañado de cantidades variables de tejido conectivo, grasa, ocasionalmente, tejido epitelial, hueso y cartílagos. Contiene también fibras nerviosas y vasos sanguíneos que, en vida del animal, proporcionan un sistema de inervación y un lecho vascular para el aporte de nutrientes y eliminación de desechos.

En el animal vivo se distinguen, tanto por su estructura como por su función, tres tipos de tejido muscular: el estriado esquelético, el músculo cardíaco y el músculo liso. En la carne, la musculatura lisa sólo representa una pequeña proporción formando parte fundamentalmente de los vasos sanguíneos, mientras que el músculo cardíaco se limita al corazón. En consecuencia, esta memoria se referirá únicamente al músculo estriado esquelético, que es el más importante cuantitativamente en la carne.

El documento CAC/RCP 58/2005 del Codex Alimentarius define el término carne como “todas las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin”. Incluye la parte comestible de los músculos de los bóvidos, óvidos, suidos, cápridos, équidos y camélidos sanos, sacrificados en condiciones higiénicas. Por extensión, se aplica también a la de los animales de corral, caza y mamíferos marinos. La carne ha de estar limpia, sana y debidamente preparada. El término carne incluye los músculos del esqueleto, los de la

lengua y los del diafragma y esófago, con o sin grasa, así como porciones de hueso, piel, tendones, aponeurosis, nervios y vasos sanguíneos que normalmente acompañan al tejido muscular y que no se separan de éste en las operaciones de preparación de la carne.

I.3.3. ESTRUCTURA DEL TEJIDO MUSCULAR

Como se mencionó anteriormente, la carne procede mayoritariamente del músculo estriado esquelético, que supone alrededor del 40% del peso corporal total. Se compone de múltiples células o fibras individuales que se agrupan formando haces o fascículos cuyo tamaño varía dependiendo del número de fibras asociadas. A su vez, varios haces se agrupan entre sí, rodeados de tejido conjuntivo y con infiltraciones de grasa, para conformar el músculo.

En el corte transversal de un músculo diseccionado, al que se ha separado del tejido adiposo subcutáneo (Figura I.26), se pueden distinguir, de fuera hacia adentro, las siguientes estructuras:

- **Epimisio:** gruesa capa de tejido conectivo que rodea al músculo. Se prolonga hasta los extremos de los músculos y se une a otras estructuras conjuntivas para formar las aponeurosis y los tendones, por donde el músculo se ancla al tejido óseo.
- **Perimisio:** vaina de tejido conjuntivo que envuelve a cada fascículo muscular.
- **Endomisio:** capa de colágeno, elastina y reticulina que rodea a cada fibra muscular de forma individual.

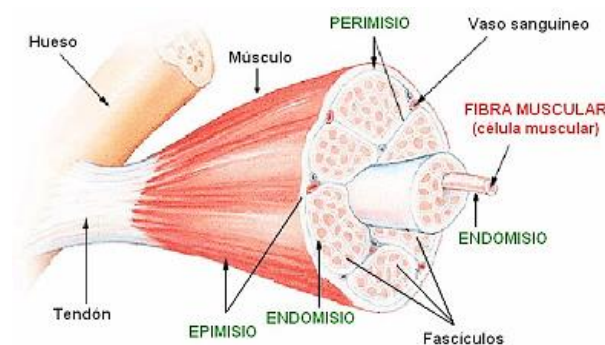


Figura I.26. Corte transversal de músculo esquelético.

Las fibras musculares, también llamadas miocitos, se encuentran distribuidas de forma paralela y están rodeadas de una membrana que se denomina sarcolema, conteniendo el sarcoplasma, un material semifluido que presenta proteínas solubles y pequeñas partículas de glucógeno, inclusiones de grasa y mitocondrias. El interior de la fibra contiene las miofibrillas (1 y 2 μm de diámetro) ordenadas longitudinalmente, y constituidas por miofilamentos. Estas estructuras conforman el aparato contráctil y son responsables del aspecto estriado del músculo. Las miofibrillas presentan una estructura formada por moléculas de cadena larga y pequeño diámetro, enlazadas lateralmente a través de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas, dando lugar a una red tridimensional en la que el agua permanece inmovilizada en mayor o menor grado.

La contracción del músculo consiste en el deslizamiento de los miofilamentos de actina (filamentos finos) sobre los miofilamentos de miosina (filamentos gruesos). Como se muestra en la Figura I.27, a nivel microscópico, el sarcómero, unidad anatómica y funcional del músculo, exhibe bandas oscuras (bandas A) y bandas claras (bandas I). Las bandas I son intersectadas por la línea Z. A su vez, las bandas A son intersectadas por la línea M. Separando la banda A de la línea M se encuentra un espacio claro llamado zona H. La disposición de todas estas bandas y líneas constituye la organización de la maquinaria contráctil de la fibra muscular que se extiende de una línea Z a la siguiente. La banda I del sarcómero está constituida por los filamentos finos de actina. La banda A contiene las fibras de miosina. Ambas fibras se superponen en el espacio de la banda A. Durante la contracción muscular, las bandas A mantienen su espesor, mientras que las bandas I se estrechan.

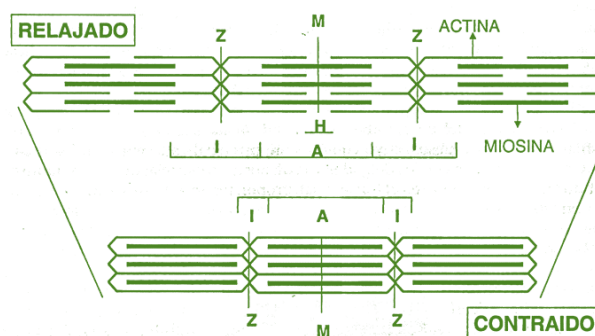


Figura I.27. Esquema de la contracción muscular.

Según la relación entre las miofibrillas y el sarcoplasma se diferencian dos tipos de fibras: rojas y blancas. Las fibras rojas presentan un número reducido de miofibrillas, que se agrupan en determinadas zonas, denominadas campos de Cohnheim. El sarcoplasma es muy abundante y contiene una elevada cantidad de mioglobina (Mb), de mitocondrias y de gotas lipídicas. Son fibras de contracción lenta, sostenida y agotamiento pausado siempre que dispongan de oxígeno (Belitz *et al.*, 2012). Presentan una baja actividad metabólica oxidativa, lipásica, hexoquinasa y de síntesis de glucógeno (Aberle *et al.*, 2012). Las blancas, de contracción intensa, rápida y fugaz agotamiento, se caracterizan por la abundancia de miofibrillas que ocupan casi la totalidad del sarcoplasma. Este último es, por tanto, muy escaso y también su contenido en Mb y mitocondrias. Estas fibras tienen mayor diámetro que las rojas, mayor contenido de glucógeno, creatín-fosfato, ATP y fructosa 1,6-difosfato y mayor actividad fosforilasa, ATPásica y glucolítica. También existen fibras de tipo intermedio que comparten las características de las anteriores (Aberle *et al.*, 2012).

La fibra muscular suele ser polinucleada. En la mayoría de las especies animales las fibras rojas y blancas están más o menos mezcladas al azar en los haces musculares. Sin embargo, en el cerdo, en la mayoría de los músculos, las fibras rojas se localizan en forma de pequeños grupos cerca del centro de los fascículos y están rodeadas de fibras blancas que forman la periferia de los haces (Aberle *et al.*, 2012).

Los músculos se clasifican como rojos o blancos basándose fundamentalmente en la intensidad de su color, que a su vez depende de la proporción de fibras rojas y blancas que contengan y éstas, en definitiva, del contenido en Mb.

I.3.4. COMPOSICIÓN DEL MÚSCULO PORCINO

I.3.4.1. Agua

El contenido en agua de la carne de cerdo es, aproximadamente, del 75%, siendo muy similar al de otras especies de abasto como pollo y vacuno (Primo, 1997; Fennema *et al.*, 2010). El agua de la canal se encuentra principalmente en el tejido muscular magro; el tejido adiposo contiene poca agua. En conjunto se estima que en el tejido conectivo se

encuentra aproximadamente el 10 % del agua de la carne, mientras que las proteínas sarcoplásmicas se asocian con un 20% del contenido acuoso. El mayor porcentaje de agua (alrededor del 70%) se encuentra asociada a la estructura de las miofibrillas. Muchas de las propiedades físicas de la carne, como el color, la textura y la firmeza, dependen en parte de su capacidad de retención de agua (CRA) de la carne (Kim *et al.*, 2013), que está muy relacionada con el pH final de la misma. La CRA es un parámetro fisicoquímico que se podría definir como la aptitud de la carne para retener el agua que ella misma contiene durante la aplicación de fuerzas externas tales como cortes, calentamiento, trituración y prensado, lo que tiene especial interés durante su conservación, fileteado, cocinado y transformación.

El agua del tejido muscular puede encontrarse en distintas localizaciones (Pearce *et al.*, 2011):

- **Enlazada de una manera directa a los grupos hidrófilos de las proteínas musculares.** Este contenido acuoso se encuentra fuertemente ligado a las estructuras celulares y apenas se ve afectada por los cambios ocurridos durante los procesos *postmortem*. Por otra parte, contribuye a la estabilidad de las formas moleculares proteicas durante el procesado de la carne (como la desecación, la congelación, etc.).
- **En los espacios intermiofibrilares,** localizada entre los miofilamentos de las proteínas musculares (agua intramiofibrilar). La amplitud de estos espacios puede variar en función de varios factores: pH, longitud del sarcómero, fuerza iónica o presión osmótica.
- **En el espacio extramiofibrilar,** entre las miofibrillas, se encuentra agua en estado más libre, menos ligada. Su porcentaje se incrementa a expensas del agua intramiofibrilar durante determinados procesos de transformación, al quedar reducidas las zonas de posibles enlaces.

En consecuencia, se puede hablar de la existencia de distintos tipos de agua en el tejido muscular (Bello, 2008):

- **Agua de constitución o de estructura o agua fuertemente ligada:** Este contenido de agua estabiliza la estructura de las proteínas. Su contenido oscila entre 0,04 y 0,01 g/g de proteína, representando entre el 4 y el 5 % de los componentes del músculo. Forma una capa monomolecular en torno a las moléculas proteicas y se halla enlazada directamente a los grupos cargados y polares (NH^{3+} y COO^-). Este tipo de agua no es móvil y no puede extraerse a no ser que se provoquen modificaciones considerables de la conformación y propiedades funcionales de las proteínas. Requiere una energía de desorción elevada, entre 12 y 25 kJ/mol variaciones de volumen del orden de 0,05 ml/g de proteína. No está disponible ni como disolvente ni como reactivo y no es congelable.
- **Agua de interfase:** Representado por el pequeño porcentaje de moléculas enlazadas a la superficie de las proteínas mediante una energía de unión superior a la propia del agua normal, que le permite formar capas acuosas en torno a las moléculas proteicas. Primeramente, se constituye una segunda capa de moléculas de agua (agua de hidratación o agua ligada) ordenada en torno a los grupos hidrofílicos de las proteínas (alrededor de 0,2 g/g de proteína) y luego, capas sucesivas de moléculas con menor fijación a medida que aumenta la distancia al grupo reactivo de la proteína (entre 0,3 y 0,5 g/g de proteína). Todas estas capas de moléculas de agua organizadas en torno a las proteínas se encuentran relacionadas entre sí a través de enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo. Esta agua no es congelable, pero está disponible como disolvente y como reactivo. Tanto el agua de constitución como el agua de interfase, según la clasificación anterior, por su movilidad, se considera agua fuertemente ligada a las proteínas musculares.
- **Agua de movilidad reducida:** La movilidad del resto del contenido acuoso, (no incluido en el agua de constitución ni de interfase) está limitada por distintos mecanismos. Incluye el agua extracelular, la correspondiente al espacio sarcoplásmico y el agua retenida en los espacios capilares y microcapilares. El agua extracelular representa menos de un 10% del agua

total del músculo vivo, aunque en la carne, debido a los cambios *postmortem*, puede ascender a más de un 15%. Se trata del agua que se encuentra fuera de las células, en espacios macrocapilares y, por su movilidad, se considera agua extramiofibrilar. La liberación del agua del espacio sarcoplásmico se encuentra frenada por el comportamiento y la integridad del sarcolema. La mayor cantidad de agua se encuentra en el interior de las miofibrillas, atrapado en el retículo tridimensional constituido por los miofilamentos, especialmente de actina y miosina. Éste es el agua embebida, agua de los microcapilares o agua fijada a los miofilamentos (hasta 10 g de agua/g de proteína). Según su movilidad, este tipo de agua se corresponde con el agua intramiofibrilar.

- **Agua libre:** corresponde a las moléculas de agua que se mantienen en el músculo retenidas solamente por fuerzas superficiales. El contenido acuoso más libre es el que se encuentra en los espacios macrocapilares extracelulares, el cual puede migrar lentamente a la superficie de la carne donde se evapora o se desprende en forma de goteo.

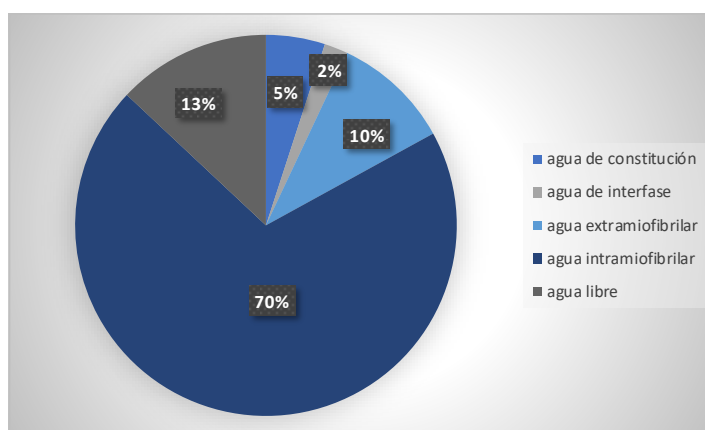


Figura I.28. Representación de los distintos compartimentos de agua en la carne.

Como se muestra en la Figura I.28, alrededor del 95% del contenido acuoso de la carne se encuentra como agua libre o agua de movilidad reducida. El agua de estas fracciones es congelable, puede disolver solutos e intervenir en diversas reacciones. Su liberación de la masa cárnica exige una energía variable, que puede valorarse sometiendo al sistema a distintas fuerzas; de esta forma, puede determinarse su

capacidad para retener o absorber este elemento. Los cambios en la capacidad de retención de agua (CRA) afectan al agua denominada "inmovilizada" y no tienen ninguna relación con el "agua ligada". El término "agua ligada" incluye tanto el agua de constitución como el agua de interfase y el resto de las fracciones se consideran "agua inmovilizada" (Pearce *et al.*, 2011). La CRA está fundamentalmente asociada a las proteínas miofibrilares, dado que la mayor cantidad de este elemento se encuentra embebida en el retículo que constituyen las miofibrillas. La cantidad de agua que esta estructura es capaz de inmovilizar depende del espacio disponible; en consecuencia, todos aquellos factores que disminuyan la cohesión entre las moléculas adyacentes (por ejemplo, el incremento de la repulsión electrostática entre las cadenas proteicas) ampliarán los espacios de la red tridimensional, aumentando la capacidad de imbibición. Por el contrario, todo agente que incremente la atracción entre las cadenas proteicas (por ejemplo, aumentando las fuerzas electrostáticas en la estructura proteica) provocará la retracción de la red tridimensional y disminuirá la cantidad de agua que ésta es capaz de albergar, forzándose la expulsión del exceso (sinéresis).

I.3.4.1.1. Exudado acuoso cárnico

Dada la relación con el contenido acuoso, y la relevancia para el desarrollo de la presente tesis doctoral, se realiza aquí una breve referencia al agua liberada por la carne denominado exudado cárnico. Una manifestación de la CRA de la carne son las pérdidas por goteo y la aparición de exudados en torno a las porciones cárnicas, especialmente apreciables en los cortes de las porciones cárnicas (superficies de contacto en envases y contenedores). Esta liberación se traduce en pérdidas de peso, cambios en la palatabilidad e incluso modificaciones en el valor nutritivo al arrastrar todo tipo de componentes hidrosolubles, como ciertas vitaminas, minerales, proteínas (tanto sarcoplásmicas como miofibrilares), nucleótidos, aminoácidos, péptidos y enzimas solubles (Savage *et al.*, 1990). En general, los exudados cárnicos suelen representar entre 1-3% en cortes frescos (Melody *et al.*, 2004). Las pérdidas por goteo se aceleran por procedimientos de corte, prensado y, particularmente, congelación-descongelación. De hecho, se han observado pérdidas de hasta el 18% durante la congelación-descongelación de carne de cerdo (Xia *et al.*, 2009).

La exudación acuosa de la carne depende de la cantidad de fluido que se ha podido separar de la estructura muscular, especialmente de la retenida en los espacios capilares y microcapilares del entramado de los miofilamentos de actina y miosina (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). Este hecho, está potenciado por el mencionado descenso del pH y el consiguiente acercamiento al punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares y la instauración de la interacción actina-miosina (Joo & Kim, 2011); todo ello reduce el espacio disponible para la retención de agua. El fluido acuoso separado de los filamentos pasa al sarcoplasma, diluyéndolo y rebajando la presión osmótica del mismo, con el consiguiente incremento del espacio extracelular. Los músculos ricos en grasa presentan una mayor CRA, aunque se desconoce la razón de dicho efecto que posiblemente se debe a que la grasa intramuscular relaja la microestructura del músculo y permite la entrada de mayor cantidad de agua (Bello, 2008).

I.3.4.2. Proteínas

Las proteínas representan el componente más abundante de la materia seca del músculo. Además de las proteínas, en la carne se pueden encontrar otros compuestos nitrogenados como aminos, compuestos guanidínicos, compuestos de amonio cuaternario, aminoácidos libres y péptidos, pero son las proteínas las que van a desempeñar un papel fundamental en las propiedades de la carne, tanto para su consumo en fresco como para su industrialización (Larrea, 2003). Atendiendo a su solubilidad, las proteínas se pueden clasificar en tres grupos (Pospiech *et al.*, 2003):

- **Proteínas solubles (proteínas sarcoplásmicas):** extraíbles con agua o en soluciones diluidas de sal (<50mM). Este grupo supone un 30-35% de las proteínas del músculo esquelético. Constituyen un grupo heterogéneo formado por más de 100 proteínas diferentes, entre las que se encuentran pigmentos como la mioglobina y la mayor parte de enzimas involucrados en el metabolismo muscular.
- **Proteínas del aparato contráctil (proteínas miofibrilares):** son solubles en soluciones con alta fuerza iónica, especialmente a 0,6 M de KCl. Constituyen las ya mencionadas miofibrillas o unidades estructurales responsables de la

contracción muscular. Representan entre el 50-55% de las proteínas totales del músculo. Entre las más importantes se encuentran las proteínas contráctiles: actina y miosina, así como las proteínas reguladoras de la contracción, troponina, tropomiosina, proteínas M y C. Además, cabe citar la α -actinina y diversas proteínas, que se presentan en pequeñas cantidades y conforman el citoesqueleto muscular. Dentro de este grupo, las más importantes son la titina, nebulina, desmina y vinculina. Las proteínas miofibrilares son las principales responsables de las propiedades funcionales de la carne. Destaca su papel en la CRA, factor tecnológico que incide en la idoneidad del comportamiento de la carne en diversos procesos. La mayor o menor CRA será determinante de la cuantía en las pérdidas de peso por goteo, así como en lo que atañe a la calidad del producto final, ambas de gran trascendencia económica.

- **Proteínas insolubles o del estroma:** representadas por las fibras extracelulares de colágeno, elastina y reticulina. Forman parte del tejido conjuntivo que recubre las fibras y haces musculares. El colágeno es la proteína más abundante en los animales de abasto, pudiendo alcanzar el 30 % del total de proteínas corporales en los individuos adultos, con especial abundancia en piel, tendones, cartílagos y huesos. En la carne, las proteínas insolubles suponen entre un 2 y un 6% del total de las proteínas musculares.

I.3.4.3. Lípidos

Los lípidos desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de las características cualitativas de la carne y los productos cárnicos transformados, tanto en cuanto a su valor nutritivo como a sus propiedades sensoriales, al ser precursores de compuestos responsables del flavor.

La cantidad de grasa de un animal y, por tanto, de la canal, varía con la raza, el sexo, la edad, la dieta, o el peso, entre otros factores (Marusic *et al.*, 2013). El contenido en lípidos de un determinado músculo es variable; su concentración está relacionada inversamente con el contenido en agua. La mayoría de los lípidos se localizan en los

depósitos de tejido adiposo y en el caso de los músculos (Bello, 2008), asociados a los septos del tejido conectivo laxo que se encuentran entre los haces musculares (grasa intramuscular), formando lo que se conoce como veteado o marmorización. Estos lípidos dan jugosidad a la carne y, además, se comportan como un aislante, que permite que la carne infiltrada pueda ser sometida a mayores tratamientos térmicos con mínima pérdida de calidad.

La mayor parte de los ácidos grasos del material lipídico corresponde a los triglicéridos, aunque hay pequeñas cantidades de mono y diglicéridos (Prändl *et al.*, 1994). La composición en ácidos grasos, además de ser importante para la consistencia, influye en la calidad sensorial. Los porcentajes de grasa en carne de cerdo oscilan entre un 17% y un 36%, correspondiendo el porcentaje de ácidos grasos más elevado a los monoinsaturados (51%) seguido de los saturados (35%) y los poliinsaturados (13%). Por ácidos grasos individuales los porcentajes más elevados corresponden al ácido oleico (C18:1) (aproximadamente 48%), seguido del ácido palmítico (C16:11) (23%) y del ácido esteárico (C18:0) (10.6%) (Piñeiro *et al.*, 2001). Los fosfolípidos son componentes esenciales de las membranas celulares, participan en la regulación del metabolismo celular y su contenido es relativamente constante (0,8-1,0%) en los tejidos magros (Bello, 2008). Estos lípidos estructurales contienen una proporción considerable de ácidos grasos poliinsaturados, lo que resulta clave en la alteración química de la carne por ser en estos ácidos grasos donde se inicia con mayor facilidad el enranciamiento autooxidativo de los lípidos, originando cambios en el aroma, el color y el flavor de la carne (Skiba *et al.*, 2012).

I.3.4.4. Carbohidratos

Suelen constituir el 1-2% de los componentes del músculo en el animal vivo, representados principalmente por el polisacárido de reserva glucógeno. No obstante, en los procesos *postmortem*, el músculo experimenta cambios muy significativos, que caracterizan la transformación del músculo en carne. Inmediatamente después de la muerte, el tejido muscular acude a las reservas de glucógeno como fuente energética y lo degrada mediante glucólisis anaerobia. En consecuencia, el músculo se acidifica y el pH muscular alcanza un valor final que dependerá del porcentaje de glucógeno

degradado, de la raza del animal o del tipo de músculo. En definitiva, la carne contiene cierto porcentaje de ácido láctico, junto con cantidades vestigiales de algunos metabolitos con estructura de azúcares, como glucosa, glucosa-6-fosfato y otros azúcares-fosfatos (Bello, 2008).

I.3.5. ASPECTOS NUTRICIONALES DE LA CARNE DE CERDO

Como hemos visto, la carne es un alimento eminentemente proteico. No obstante, desde el punto de vista nutricional, la composición de la carne puede variar debido a diversas causas, entre las que cabe destacar la especie animal, la porción anatómica considerada y su procesado. Además, dentro de cada especie hay variaciones dependiendo de la raza, edad o alimentación entre otros factores. La edad influye en la proporción de grasa y proteínas, de manera que los animales viejos tienen más grasa intramuscular que los jóvenes ya que al avanzar la edad mayor es la grasa acumulada y menor el contenido en colágeno, sin embargo, presentan una dureza mayor debido a la mayor abundancia de entrecruzamientos entre las fibras de colágeno (Toldrá *et al.*, 1996). Los machos, en general, contienen menos grasa intramuscular que las hembras, mientras que los cerdos castrados presentan más grasa que los machos y las hembras (Toldrá *et al.*, 1996). Entre los factores extrínsecos, al ser el cerdo un animal monogástrico, el más importante es la alimentación, influyendo en las cualidades de la carne obtenida, pues si se aumenta en la dieta el contenido de hidratos de carbono o de grasa, aumenta el engrasamiento de las canales (Ordóñez *et al.*, 1998). Además, la composición en ácidos grasos depende poderosamente de los presentes en la dieta.

En la fracción comestible de la carne fresca de cerdo, el 65-80% de su peso es agua, y en ella se encuentran disueltos o suspendidos numerosos componentes químicos, ciertas proteínas (16-22%), lípidos (3-13%), minerales (1-1,5%) y otros componentes minoritarios como sustancias nitrogenadas no proteicas (aminoácidos libres, péptidos, nucleótidos, creatina), carbohidratos (trazas), ácido láctico, y algunas vitaminas. En la Tabla I.2 se detalla la composición nutricional de la carne de cerdo (Moreiras *et al.*, 2013)

Tabla I.2. Composición nutricional de la carne de cerdo.

Fuente: Tablas de composición de alimentos (Moreiras et al., 2013).

AGS: ácidos grasos saturados; AGM: ácidos grasos monoinsaturados; AGP: ácidos grasos poliinsaturados.

Aporte por ración (100 g de porción comestible)		Minerales		Ácidos grasos	
Energía [Kcal]	219,00	Calcio [mg]	9,00	Mirístico C14:0 [g]	0,31
Proteína [g]	17,50	Hierro [mg]	1,80	Palmitico C16:0 [g]	4,03
Hidratos carbono [g]	1,00	Yodo [mg]	2,00	Estearico C18:0 [g]	2,65
Fibra [g]	0,00	Magnesio [mg]	18,00	Palmitoleico C16:1 [g]	0,38
Grasa total [g]	16,50	Zinc [mg]	2,70	Oleico C18:1 [g]	7,38
AGS [g]	6,99	Selenio [µg]	25,50	Linoleico C18:2 [g]	0,94
AGM [g]	7,76	Sodio [mg]	74,00	Linolénico C18:3 [g]	0,29
AGP [g]	1,23	Potasio [mg]	291,00		
AGP / AGS	0,18	Fósforo [mg]	80,00		
(AGP + AGM) / AGS	1,29				
Coolesterol [mg]	70,00	Vitaminas		Aminoácidos	
Agua [g]	66,00	Vit. B1 Tiamina [mg]	0,92	Alanina [mg]	1.055,00
		Vit. B2 Riboflavina [mg]	0,21	Arginina [mg]	1.046,00
		Eq. niacina [mg]	7,25	Ac. aspártico [mg]	1.664,00
		Vit. B6 Piridoxina [mg]	0,39	Ac. glutámico [mg]	2.676,00
		Ac. Fólico [µg]	4,00	Cistina [mg]	205,00
		Vit. B12 Cianocobalamina [µg]	0,56	Fenilalanina [mg]	669,00
		Vit. C Ac. ascórbico [mg]	0,00	Glicina [mg]	977,00
		Retinol [µg]	1,00	Histidina [mg]	677,00
		Vit. A Eq. Retinol [µg]	1,00	Isoleucina [mg]	866,00
		Vit. D [µg]	1,00	Leucina [mg]	1.321,00
				Lisina [mg]	1.509,00
				Metionina [mg]	488,00
				Prolina [mg]	823,00
				Serina [mg]	763,00
				Tirosina [mg]	712,00
				Treonina [mg]	857,00
				Triptófano [mg]	205,00
				Valina [mg]	977,00

Los minerales tienen un papel significativo en la conversión del músculo en carne. El magnesio y el calcio contribuyen al estado de contracción *post mortem*, influyendo indirectamente, por tanto, en la dureza de la carne. Están relacionados también con la CRA, por su implicación en los efectos estéricos (Price & Schweigert, 1994). En la carne fresca el contenido en minerales es del 1%. Desde el punto de vista nutricional, el hierro es el que alcanza mayor relevancia, por su elevado contenido en relación con otros alimentos y por su gran disponibilidad, lo que se debe a que se encuentra en forma hemo, presentando una excelente absorción. Además, esta estructura, potencia la absorción del hierro procedente de otras fuentes (Godber, 1994). La carne también es una importante fuente de zinc; sin embargo, es bastante pobre en calcio (Moreiras et al., 2013). Otros oligoelementos presentes son el flúor, el bromo, el yodo, el silicio, el manganeso y el cobre (Prändl et al., 1994).

Las vitaminas más abundantes en las carnes son las hidrosolubles, fundamentalmente del grupo B, destacando la B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B6 (piridoxina), B12 (cianocobalamina) y niacina, las cuales proporcionan un 25-50% de las

necesidades diarias (Windham *et al.*, 1990). Las vitaminas liposolubles se encuentran en muy pequeñas cantidades y se localizan en las fracciones lipídicas.

Los procedimientos de transformación necesarios para la obtención de derivados cárnicos implican modificaciones más o menos profundas de la estructura de la carne fresca de origen y la incorporación de otras materias primas que repercuten en la valoración nutricional del producto final, sobre todo en lo que respecta a la cantidad de grasa y contenido en sal. La Tabla I.3 muestra los principales aspectos nutricionales de los embutidos crudos curados y del jamón curado a través del empleo del “semáforo nutricional”, un sistema ideado en Gran Bretaña para conocer el valor nutritivo de los alimentos de forma sencilla, rápida y cómoda para el consumidor (Farrán *et al.*, 2003).

Tabla I.3. Semáforo nutricional de distintos embutidos crudo-curados y de jamón curado según una ración de consumo que va desde los 35 a los 60 gramos, en función del producto considerado.

Fuente: Tablas de composición de alimentos del CESNID (Farrán *et al.*, 2003)

	ENERGÍA		GRASAS		SATURADAS		AZÚCARES		SAL		FIBRA	
	(kcal)	% CDO ⁽¹⁾	(g)	% CDO ⁽¹⁾	(g)	% CDO ⁽¹⁾	(g)	% CDO ⁽¹⁾	(g)	% CDO ⁽¹⁾	(g)	% CDO ⁽¹⁾
EMBUTIDOS CRUDO-CURADOS												
Chistorra cruda, una unidad, 60 gramos	308,0	15,4	29,4	32,7	12,2	17,4	0,5	2,5	1,6	26,7	0,0	0,0
Chorizo. Una ración de bocadillo, 50 gramos.	183,5	9,2	15,0	16,6	5,8	8,3	0,9	4,5	2,4	40,0	0,0	0,0
Fuet. Una ración de bocadillo, 50 gramos.	199,9	10,0	15,5	17,2	5,3	7,6	0,0	0,0	1,5	25,3	0,0	0,0
Lomo embuchado. Una ración de bocadillo, 50 gramos.	87,3	4,4	2,3	2,5	0,8	1,2	0,2	0,8	1,2	19,4	0,0	0,0
Salchichón. Una ración de bocadillo, 50 gramos.	208,2	10,4	18,1	20,1	6,3	9,0	0,1	0,3	2,4	39,6	0,0	0,0
Sobrasada. Una ración de bocadillo, 50 gramos.	302,2	15,1	30,7	34,1	10,4	14,8	0,0	0,0	1,6	27,2	0,0	0,0
JAMÓN ración=35 gramos												
Jamón curado, con grasa, variedad sin especificar	112,0	5,6	7,9	8,8	2,8	4,0	0,1	0,4	1,9	32,0	0,0	0,0
Jamón curado, sin grasa, variedad sin especificar	67,0	3,3	2,9	3,3	1,1	1,5	0,1	0,5	2,1	34,2	0,0	0,0

Indica la proporción aportada respecto de la cantidad Diaria Orientativa (CDO) que una persona adulta necesita ingerir de cada nutriente: 2.000 kcal, 90 g de grasa, 70 g de saturadas, 20 g de azúcares, 6 g de sal y 24 g de fibra. El semáforo nutricional se basa en un sistema de colores: verde-baja cantidad (la aportación es del 7,5% de la CDO), amarillo-cantidad media (entre el 7,5% y el 20%) y naranja-cantidad alta (más del 20%). La fibra no tiene color porque escasea en la dieta.

A este respecto, en octubre de 2015, el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC), perteneciente a la Organización Mundial de la Salud (OMS), emitió un informe evaluador de la carcinogenicidad del consumo de carne roja y carne procesada (OMS, 2015). Dados los productos incluidos en la presente Tesis Doctoral y la repercusión de dicho informe en los medios de comunicación, la opinión pública y las reacciones suscitadas en el seno de la industria cárnica a nivel mundial, el resultado de dicho informe merece ser mencionado. Como resultado del estudio, la carne roja (parte muscular de los mamíferos, incluyendo carne de res, ternera, cerdo, cordero, caballo y

cabra) ha sido clasificada como Grupo 2A, probablemente cancerígena para los seres humanos. Dicha clasificación se basa en una *evidencia limitada* procedente de estudios epidemiológicos que muestran una asociación positiva entre el consumo de carne roja y el desarrollo de cáncer colorrectal. La carne procesada (carne que ha sido transformada a través de la salazón, el curado, la fermentación, el ahumado, u otros procesos para mejorar su sabor o su conservación) fue clasificada como Grupo 1, cancerígeno para los seres humanos. Esta categoría se utiliza cuando hay *suficiente evidencia* de carcinogenicidad en humanos. Los expertos afirman que el consumo de 50 gramos de productos cárnicos al día supone incrementar el riesgo de cáncer colorrectal en un 18%, sin haber especificado qué tipo de productos ni el método de elaboración utilizado. Esta evaluación del CIIC refuerza la recomendación de 2002 de la OMS acerca de moderar el consumo de carne para reducir el riesgo de cáncer colorrectal. Algunas otras directrices sobre la dieta también recomiendan limitar el consumo de carne roja o carne procesada, pero éstas se centran principalmente en la reducción de la ingesta de grasa y sodio, que son factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares y la obesidad.

I.4. DERIVADOS CÁRNICOS

Además del consumo en fresco, la carne de cerdo es susceptible de ser sometida a múltiples procesos de transformación que conducen a la elaboración de distintos tipos de derivados cárnicos, lo que permite la diversificación de la materia prima y la obtención de productos de gran calidad y con amplia vida útil. La mayoría de estos productos son altamente apreciados por el consumidor y, económicamente, aportan grandes beneficios a la industria cárnica, de ahí la necesidad de conocer a fondo los procesos tecnológicos y las transformaciones bioquímicas implicadas. A continuación, se abordan los detalles de elaboración de los productos estudiados en esta Tesis Doctoral: jamón curado y embutidos crudos curados.

I.4.1. GENERALIDADES

La búsqueda de soluciones para la conservación de alimentos ha estado siempre ligada a la evolución humana y aún hoy es un reto para la sociedad. Entre los primeros métodos utilizados para este fin destacan el secado y la fermentación.

La fermentación representa, probablemente, uno de los procesos biotecnológicos más antiguos. Esta técnica, que se ha empleado desde la Prehistoria para la conservación de alimentos durante periodos prolongados de tiempo, consume poca energía y da lugar a un producto de elevada calidad (Molly *et al.*, 1997). Aunque empírica en sus orígenes, hoy sabemos que la microbiota presente en el producto tiene una participación decisiva en los procesos fermentativos ya que los microorganismos fermentadores participan tanto en garantizar la estabilidad microbiológica del alimento fermentado como en la consecución de sus características sensoriales (Ordoñez *et al.*, 1999).

Igualmente, el curado es otra técnica ancestral de conservación que también surgió como un medio de evitar o retrasar la alteración del producto fresco. En esencia, la estabilización del producto se consigue mediante la adición de sal y deshidratación. El tiempo de curado y las condiciones de temperatura y humedad son claves para el desarrollo de los atributos sensoriales peculiares que caracterizan al producto y que

surgen de complejas reacciones microbiológicas, químicas y bioquímicas y las interacciones entre ellas (Toldrá, 2006).

Actualmente la fermentación y el secado de la carne han dejado de ser métodos cuyo objetivo primero era la conservación para convertirse en una forma de diversificación de productos. La pérdida de la estacionalidad en la disponibilidad de la carne, el desarrollo de la refrigeración y de la congelación y el de otros procesos tecnológicos han transformado la fabricación de los derivados cárnicos. En la actualidad, la industria cárnica está encaminada a la obtención de productos muy variados, de alta calidad y con características muy distintas a las de las materias primas de partida. A esto se une el hecho de que muchos derivados cárnicos presentan una extensa vida útil, sin necesidad de otras medidas adicionales de conservación, y el escaso riesgo sanitario que su consumo conlleva, lo que ha ocasionado que la producción de derivados cárnicos se haya hecho un hueco importante dentro del sector alimentario.

Con el fin de obtener productos de calidad, un aspecto fundamental en la elaboración de los productos cárnicos es la selección de la materia prima. En este sentido, cabe destacar la necesidad de evitar el empleo de carnes con defectos asociados al manejo y al sacrificio del animal. La energía requerida para la actividad muscular en un animal vivo se obtiene de los azúcares (glucógeno) presentes en el músculo. En un animal sano y descansado, el nivel de glucógeno de sus músculos se encuentra en torno al 1%. Una vez sacrificado el animal se van a producir una serie de cambios que conducen a la ya mencionada transformación del músculo en carne, proceso en el cual está implicada, por una parte, la formación de ácido láctico a partir de la reserva de glucógeno, siguiendo un ciclo de glucólisis en condiciones anaerobias. El consiguiente acumulo de ácido láctico es el principal responsable de la bajada de pH de la carne *postmortem*. Por una parte, la aparición de enlaces cruzados permanentes entre los filamentos de actina y de miosina, debido al agotamiento del ATP requerido para la relajación, conduce a la manifestación de una rigidez generalizada de los músculos (*rigor mortis*). La instauración de esta situación de contracción irreversible del músculo se resuelve por una degradación física de la estructura muscular por la acción enzimática endógena, dando lugar a la carne. El perfil o velocidad del descenso del pH, y en menor medida el nivel de

degradación proteica y la acción enzimática, están íntimamente relacionados con la incidencia de carnes pálidas, blandas y exudativas (PSE, del inglés '*pale, soft and exudative*') así como de carnes oscuras, firmes y secas (DFD, del inglés '*dark, firm and dry*'). Una rápida acidificación causada por un metabolismo muscular acelerado en cerdos susceptibles a estrés daría lugar a carnes PSE, mientras que un reducido contenido de glucógeno *antemortem* mantendría el pH cercano a la neutralidad, dando lugar a carnes DFD (Batlle *et al.*, 2000; Scheffler & Gerrard, 2007). Los defectos de calidad de estos tipos de carnes están íntimamente relacionados con su CRA, disminuida en el caso de las carnes PSE (pérdidas de exudado de hasta un 10% del peso) e incrementada en el caso de la DFD. En ambos casos, su destino industrial está condicionado, tanto por su aptitud tecnológica como por su conservación. Así, por ejemplo, la carne PSE no resulta apropiada, por su escasa capacidad de retención de agua, para la elaboración de jamón cocido ni para elaborar jamón curado (Arnau *et al.*, 1995). En cambio, la carne DFD es apropiada para productos del tipo emulsión cárnica (mortadelas y salchichas) y jamones cocidos, pero tampoco es aconsejable para fabricar jamón curado (especialmente peligroso en el caso de jamones con hueso) debido a su poca difusión de sal y su fácil alteración microbiana (Arnau *et al.*, 1998).

I.4.2. DEFINICIÓN DE DERIVADOS CÁRNICOS

El Real Decreto (R.D.) 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos, los define como "*los productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes o menudencias de las especies domésticas bovina, porcina, ovina, caprina, aves de corral, lagomorfos y especies de caza silvestre*". Este R.D. establece su clasificación en función del tratamiento al que han sido sometidos, y describe sus características de composición, calidad y etiquetado. Esta normativa clasifica a los derivados cárnicos según se obtengan de piezas cárnicas enteras (jamón curado) o carnes picadas (embutidos crudos curados).

Según el citado R.D., los productos objeto de la presente Tesis Doctoral (jamón, chorizo y salchichón curados) se incluyen en el grupo de derivados cárnicos no tratados por calor, curado-madurados. Integran este grupo los productos sometidos a procesos tecnológicos no térmicos, de salazón y de curado-maduración, suficiente para

conferirles las características organolépticas propias y de estabilidad a temperatura ambiente, pudiendo someterse opcionalmente a fermentación y ahumado.

I.4.3. JAMÓN CURADO

I.4.3.1. Definición

Es el producto elaborado con la extremidad posterior del cerdo que se ha sometido, con carácter general, a un proceso de salazón, acompañado eventualmente de adición de especias, condimentos y aditivos, lavado, reposo o postsalado, maduración y secado durante el tiempo suficiente para conferirle las características organolépticas propias (R.D. 474/2014).

El pernil es la pieza anatómica que se obtiene de la canal porcina después de seccionar la sínfisis isquiopubiana (Figura I.29).

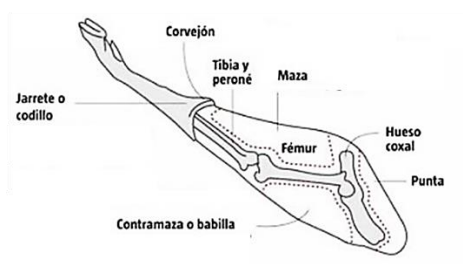


Figura I.29. Representación de las principales partes de un pernil de cerdo.

Anatómicamente, se compone de los huesos coxal, fémur, tibia, peroné, tarso, metatarso y falanges; las masas musculares correspondientes a los músculos bíceps femoral, semitendinoso, tensor de la fascia lata, glúteo superficial, glúteo medio, glúteo profundo, obturador interno, gemelos, aductor, gracilis, pectíneo, iliopsoas, cuádriceps femoral, sartorio, poplíteo, gastronemio y sóleo; la grasa de cobertura y la piel (Olmos, 2006).

I.4.3.2. Tipos de jamones curados en España

La mayoría de jamones curados que se elaboran en España proceden de cerdos blancos alimentados con piensos concentrados comerciales y criados en explotaciones

intensivas. Estos animales están vinculados a los genotipos más empleados industrialmente, como *Large White*, *Pietrain*, *Landrace* o de sus cruces. En general, los cerdos se sacrifican a los 5-6 meses de edad, cuando han alcanzado 100-120 Kg de peso. Por el contrario, los cerdos ibéricos se crían mediante un sistema tradicional en explotaciones extensivas; los animales se sacrifican con 18-24 meses de edad debido a su lento crecimiento. Este proceder influye notablemente en la calidad de la carne y en el grado de engrasamiento, que se manifiesta fundamentalmente durante los últimos cuatro meses del período de cebo.

No todos los jamones curados de cerdo blanco producidos en España son iguales, ya que sus características dependen de diversos factores relativos al animal, tipo de crianza, alimentación, edad de sacrificio y proceso de elaboración. Estos factores proporcionan al producto final unas características físicas y sensoriales peculiares y diferenciales.

La Unión Europea despliega una política que favorece la producción de calidad garantizada que refrenda mediante el etiquetado de los productos con Denominación de Origen Protegida (D.O.P.), Indicación Geográfica Protegida (I.G.P.) y Especialidad Tradicional Garantizada (E.T.G.). En este contexto cabe mencionar:

- Jamón serrano (E.T.G.)
- Dehesa de Extremadura, Guijuelo, Jamón de Huelva y Jamón de Teruel (D.O.P.)

I.4.3.3. Proceso de elaboración

La producción de jamón curado comprende una serie de etapas que se detallan a continuación (Ventanas, 2001) (Figura I.30).



Figura I.30. Principales etapas en la elaboración de jamón curado.

I.4.3.3.1. Selección del pernil

Se basa en factores extrínsecos (genética del animal, edad y peso al sacrificio, sexo, alimentación y sistemas de explotación) e intrínsecos (fundamentalmente CRA, contenido de grasa y evolución del pH después del sacrificio). Como se mencionó en el apartado I.3.1., el seguimiento de la evolución del pH durante el proceso *postmortem* de la canal (en este caso, en especial del pernil) es de especial relevancia, con el fin de evitar el uso tanto de carnes DFD como PSE. En el primer caso, su gran CRA serían un obstáculo para una correcta hidratación y penetración de la sal (Toldrá, 2006). En el caso de las carnes PSE, hay riesgo de producirse elevadas pérdidas por secado, mayor absorción de sal, color pálido y escaso aroma (Arnau *et al.*, 1995).

I.4.3.3.2. Preparación y acondicionamiento de la materia prima

En primer lugar, se realiza el perfilado del pernil, que consiste en la eliminación de porciones de músculo, grasa y piel, para conferir a las piezas las proporciones y características típicas de la conformación de los diferentes tipos de jamones. Posteriormente, se lleva a cabo el sangrado, en el que se procura la evacuación mediante presión manual o mecánica, de restos de sangre remanentes en la musculatura, con el fin de minimizar la posible alteración microbiológica.

I.4.3.3.3. Salado

Esta etapa consiste en la incorporación de las denominadas sales del curado, compuestas por cloruro sódico, sales nitrificantes (nitratos y nitritos) y coadyuvantes del curado (azúcares y ascorbatos). La finalidad de esta operación es potenciar el sabor, crear condiciones desfavorables para la multiplicación de la microbiota alterante y

patógena y regular las actividades bioquímicas que acaecen durante la maduración. El empleo de dichas sales del curado es común en el proceso de elaboración de distintos productos madurados, como los embutidos curados, que se abordan a continuación. Los detalles sobre la funcionalidad de estas sales se contemplan en el apartado I.4.4.3.2. de esta memoria.

Los perniles están en contacto directo con las sales durante un tiempo que varía en función de su tamaño. En la actualidad, la relación suele ser de 0,7 día/kg de peso. La temperatura durante el salado puede considerarse como un factor regulador de la duración del mismo. En las instalaciones actuales, se mantiene siempre por encima de 1 °C, para que no cristalice el agua, y por debajo de 3 °C, para impedir el crecimiento de *Clostridium botulinum*. La humedad relativa de las cámaras de salado se mantiene en torno a 90%, o incluso superior, para impedir en la medida de lo posible, la evaporación del agua que, por ósmosis, afloraría desde el interior de los perniles.

I.4.3.3.4. Reposo o post-salado

Después del salado, debe eliminarse el exceso de sal e impurezas que se encuentran en la superficie. Para ello, las piezas se lavan con agua fría, se cepillan y se colocan en cámaras para escurrirlas donde seguidamente se someten a un masaje mediante presión de las masas musculares laterales para desplazarlas hacia el centro y darles la forma adecuada. Posteriormente, se trasladan a una cámara de post-salado refrigeradas (24 °C), haciendo descender la humedad relativa desde el 85 hasta el 75%. En estas cámaras permanecen entre 1 y 3 meses, produciéndose una merma en peso del 10-12%, que conlleva un descenso de la actividad del agua (a_w) hasta valores inferiores a 0,96-0,92. En esta fase, se alcanza lo que se conoce como asentamiento de las piezas, que corresponde a una distribución homogénea de las sales del curado en todo el perrnil.

I.4.3.3.5. Secado-maduración

Esta fase es la más larga del proceso, aunque su duración es variable, desde meses en los cerdos de raza blanca hasta más de un año en los cerdos ibéricos, y es crucial para el desarrollo del sabor y aroma merced a reacciones de degradación (proteólisis, lipólisis, y oxidaciones) y síntesis (generación de moléculas sápidas de bajo peso molecular y volátiles). Además, en esta etapa se estabiliza el color y se produce una

deshidratación adicional que asegura la estabilización del jamón. El secado se lleva a cabo en secaderos industriales y/o bodegas y se caracteriza por desarrollarse a una temperatura más elevada y una humedad relativa más baja que las fases anteriores. Las variaciones de temperatura y humedad se producen de forma suave y paulatina, considerando que la temperatura oscila desde los 7-9 °C hasta los 28-30 °C y la humedad relativa se reduce hasta un 85%. Al tener una temperatura más elevada, la grasa se funde e impregna las fibras musculares e incluso puede llegar a enmascarar la identidad del miosistema, lo que se conoce como *sudado del jamón*. El periodo en el que se alcanza la temperatura máxima se denomina *estufaje*. Transcurrido este periodo, el jamón se somete a un proceso de afinado en bodega para favorecer las reacciones que dan lugar a los compuestos responsables de las características organolépticas del producto acabado.

I.4.4. EMBUTIDOS CÁRNICOS

I.4.4.1. Definición

Los embutidos son derivados cárnicos, generalmente constituidos por carne picada, contenidos en una tripa o envoltura artificial (R.D. 474/2014).

Dentro de este grupo, los chorizos y salchichones son derivados cárnicos constituidos por trozos de carne y grasa no identificables anatómicamente que, con carácter general y no limitativo, se han sometido a un proceso de picado más o menos intenso, mezclados con especias, ingredientes, condimentos y aditivos, embutidos en tripas naturales o envolturas artificiales, y sometidos a un proceso de salazón seguido de curado-maduración, acompañado de fermentación, suficiente para conferirles las características organolépticas propias y su estabilidad a temperatura ambiente. Se les añade pimentón, a los chorizos, y pimienta, a los salchichones, como ingrediente caracterizante (R.D. 474/2014).

I.4.4.2. Tipos de chorizos y salchichones

Los chorizos y los salchichones tienen un origen primitivo ya que están estrechamente ligados a la matanza del cerdo, una de las tradiciones gastronómicas,

festivas, culturales y hasta religiosas con más tradición en las sociedades rurales, mediante la cual, las familias se abastecían de una reserva de carne para todo el año. Por ello, son derivados cárnicos cuya producción está muy extendida por el territorio nacional y casi todas las Comunidades Autónomas tienen sus embutidos característicos.

Hay múltiples tipos de chorizos y salchichones dependiendo de la carne utilizada en su elaboración, de las especias añadidas, de la zona de curación, de su forma de atado, de su medida o peso, etc. Según la carne de cerdo utilizada, los chorizos y salchichones se clasifican en:

- Ibérico de Bellota: elaborado a partir de carne de cerdo ibérico de Bellota.
- Ibérico: elaborado con carne de cerdo ibérico.
- Casero tradicional: elaborado con carne de cerdo blanco.

Como ocurre con el jamón curado, distintos chorizos y salchichones son productos con marca de calidad garantizada, destacando las I.G.P.:

- Chorizo de Cantimpalo
- Chorizo Riojano
- Salchichón de Vic

I.4.4.3. Proceso de elaboración

La elaboración de un embutido fermentado de calidad requiere un proceso fermentativo en el que se produce un descenso del pH y una etapa de maduración en la que se desarrollan el aroma y textura típicos como consecuencia de los numerosos procesos químicos y enzimáticos que tienen lugar. También es imprescindible la subsiguiente fase de desecación, ya que en ella se produce una reducción de la a_w que, en combinación con la disminución del pH, hace que el embutido adquiera su capacidad de conservación, además de la consistencia adecuada (Ordóñez *et al.*, 1999).

A continuación, se detallan las principales etapas que comprende la elaboración de embutidos crudos curados (Ordóñez & de la Hoz, 2001) (Figura I.31).

I.4.4.3.1. Picado de la carne y la grasa

La carne que se utiliza normalmente para la elaboración de estos productos es de cerdo, ternera y/o pollo. Debe estar libre de coágulos de sangre y con un valor de pH entre 5,6-6,2, no siendo aconsejable utilizar carnes DFD ni PSE, como se mencionó en el apartado I.3.1. Generalmente suele utilizarse grasa animal y preferentemente de cerdo. Es conveniente seleccionar grasa con alto grado de saturación para prevenir los defectos de enranciamiento, por lo que es recomendable emplear grasas de depósito dorsal o de panceta. El picado puede realizarse en una picadora o en una cutter (si se desea un picado más fino) y para evitar fenómenos de embarrado es aconsejable que se lleve a cabo a una temperatura de 0 °C o incluso menor.



Figura I.31. Principales etapas en la elaboración de embutidos curados.

I.4.4.3.2. Mezclado con el resto de ingredientes y aditivos

Además de la carne y la grasa, los embutidos curados contienen una serie de aditivos que cumplen diversas funciones durante el proceso de elaboración y que contribuyen a las características del producto final. Como se abordó en el apartado I.4.3.3.3. de esta memoria, los aditivos contemplados en este punto se emplean también en la elaboración de jamón curado, por lo que se tratan aquí como ingredientes comunes, haciendo hincapié en las particularidades y diferencias de cada proceso de elaboración.

I.4.4.3.2.1. Sal común

Además de mejorar el sabor, su importancia tecnológica radica en su influencia sobre múltiples reacciones de los procesos de maduración y desecación. Además, contribuye a la reducción de la a_w y restringen las condiciones de desarrollo de algunos microorganismos patógenos o alterantes. La sal ejerce un papel primordial en la CRA y

la ligazón de la masa, ya que interviene en la solubilización de las proteínas cárnicas, que permitirá la formación de un gel estable y consistente (Lucke, 1998).

I.4.4.3.2.1.1. Efecto de la sal en la CRA

La CRA se define como la capacidad que tiene la carne para retener el agua libre durante la aplicación de fuerzas externas, tales como el corte, la trituración y el prensado. Muchas de las propiedades físicas de la carne como el color, la textura y la firmeza de la carne cruda, así como la jugosidad y la suavidad de la carne procesada, dependen en parte de la CRA. Esta propiedad es particularmente importante en productos picados o molidos, en los cuales se ha perdido la integridad de la fibra muscular y, por tanto, no existe una retención física del agua libre por la estructura celular.

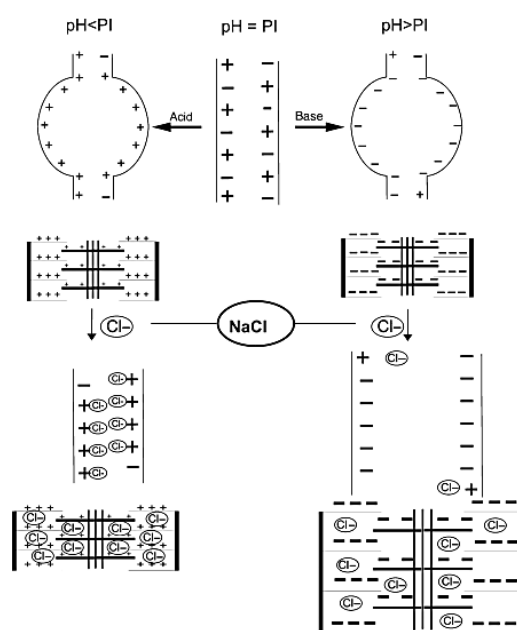


Figura I.32. Efecto de la adición de sal sobre la CRA (Albarracín et al., 2011). PI: punto isoeléctrico.

El aumento de la CRA de las proteínas cárnicas por efecto de la adición de sal se atribuye a la unión preferencial del anión Cl^- por las moléculas proteicas. Como se observa en la Figura I.32, por encima del punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares ($\text{pH} > \text{PI}$), esta unión incrementa la carga neta negativa y aparecen fuerzas de repulsión que permiten una absorción de agua adicional por parte de la red proteica. En contraste, a pH inferiores al punto isoeléctrico ($\text{pH} < \text{PI}$), la carga positiva de las proteínas es

neutraliza por los aniones Cl^- , cerrando los espacios interproteicos y, por tanto, reduciendo la CRA (Albarracín *et al.*, 2011) (Figura I.32).

I.4.2.4.3.2.1.2. Difusión

Este proceso es especialmente importante en derivados cárnicos elaborados a partir de piezas musculares enteras, como el jamón curado, en cuya elaboración la etapa de salado es fundamental para el desarrollo de las características del producto final. En estos casos, la mayoría de estudios realizados muestran que el movimiento de la sal en el interior de las piezas cárnicas se produce mediante fenómenos de difusión (Gou & Comaposada, 2000), influenciados por la diferencia de concentraciones entre el exterior y la superficie, y por el área de carne que permanece en contacto con la sal (Carrasco, 2001).

En las piezas cárnicas, el proceso de difusión será diferente según las características de la zona de la carne por la que la sal penetra. El cloruro sódico difunde a través de la fase acuosa líquida del músculo (Gou & Comaposada, 2000), pero en alimentos sometidos a procesos de secado esta fase no permanece inmóvil, sino que se mueve hacia el exterior y va arrastrando la sal en sentido opuesto al del agua. Otro factor implicado en la penetración de la sal al interior del producto es el contenido en materia seca del músculo y su composición, que van a determinar tanto la cantidad, como el recorrido de la sal, e incluso va a actuar directamente sobre ella, fijándola a la estructura de la proteína.

En el caso de la elaboración de productos embutidos, los fenómenos anteriores no proceden. En la carne picada, la estructura miofibrilar está interrumpida y presenta un elevado desarrollo superficial que facilita la mezcla con la sal, que será incorporada en un reducido porcentaje (3-4%, dependiendo de la formulación). En el trabajo de mezcla, la sal se incorpora de forma homogénea con los componentes de la carne.

I.4.4.3.2.2. Nitratos y nitritos

El compuesto activo de las sales de curación es el nitrito, añadido directamente o proveniente de la reducción de nitrato. El principal objetivo de la adición de nitratos y nitritos a los productos curados es la inhibición de microorganismos indeseables como

Clostridium botulinum. Además, contribuye a la formación del color característico del curado (por formación del complejo nitrosomioglobina) al desarrollo del aroma, por reacción de varios componentes de la carne con el nitrito o el óxido nítrico, y a previene la oxidación de los componentes lipídicos. A pesar de todos sus efectos positivos en el proceso tecnológico, hay que considerar que el uso de estos aditivos conlleva un riesgo de formación de N-nitrosaminas, compuestos que pueden resultar altamente tóxicas. Estas sustancias se forman como resultado de la reacción del nitrito con aminas secundarias. Debido a su toxicidad, los niveles permitidos de nitratos y nitritos han sido reducidos en los últimos años. Las cantidades legalmente permitidas en España son 150 ppm para los nitritos y 300 ppm para los nitratos. Además, las cantidades residuales de nitritos y nitratos en el producto final no deben superar las 50 y 250 ppm, respectivamente (R. D. 142/2002).

I.4.4.3.2.3. Azúcares

Los azúcares fermentables (glucosa o sacarosa), se adicionan como sustrato energético de los microorganismos que intervienen en el proceso de acidificación. El descenso de pH puede ser más o menos pronunciado según el tipo y la cantidad de azúcar adicionado. La glucosa es asimilada rápidamente por casi todos los microorganismos, pero también se utilizan lactosa, sacarosa u otros azúcares menos asimilables como el almidón o dextrinas para regular la velocidad de la acidificación (Lücke, 1998). El descenso de pH tiene varios efectos beneficiosos, entre los que cabe mencionar:

- reduce la CRA, favoreciendo la deshidratación del producto,
- inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos y proteolíticos que pueden entorpecer el proceso de maduración,
- interviene en el proceso de enrojecimiento, favoreciendo la reducción del nitrito a óxido nítrico,
- facilita la gelificación de las proteínas cárnicas, garantizando la correcta ligazón y consistencia del producto.

I.3.4.3.2.4. Ascorbato

Es una sustancia antioxidante y coadyuvante del proceso de curado que ayuda a disminuir la cantidad de nitrito residual puesto que favorece su transformación a óxido nítrico con lo que, además, mejora la formación y estabilización del color. La legislación española, R. D. 142/2002, permite la adición de ácido L-ascórbico o ascorbato sódico en dosis *quantum satis*, habitualmente 0,5 g/Kg.

I.3.4.3.2.5. Especies

Son ingredientes vegetales con carácter aromático que se utilizan habitualmente en pequeñas cantidades para conferir determinados sabores, aromas y colores a los productos cárnicos. Además de sus propiedades aromáticas, muchas especias son antioxidantes y antimicrobianas. Su empleo varía según el tipo de producto, pero, en general, las más utilizadas son: pimentón, ajo, clavo, nuez moscada, cilantro, cebolla, orégano, pimienta y tomillo.

I.3.4.3.2.6. Cultivos iniciadores

Los microorganismos desempeñan un papel decisivo en la fabricación de embutidos fermentados, ya que están directamente implicados en la reducción de nitratos a nitritos, el descenso del pH, la formación del aroma, la estabilidad del color y la capacidad de conservación del producto. Si la materia prima es de buena calidad higiénica y se mantienen las condiciones adecuadas se pueden fabricar embutidos tradicionales de excelente calidad. Sin embargo, no todos los microorganismos presentes en las materias primas contribuyen a la maduración prevista, y algunos de ellos pueden derivarla hacia una dirección indeseable. Para corregir posibles defectos en la maduración del producto se suele optar por utilizar cultivos de microorganismos seleccionados (cultivo iniciador o *starters*). De esta forma la industria cárnica pretende asegurar una producción homogénea, estabilizada y segura.

Como microbiota natural de la carne fresca o como cultivo iniciador, es especialmente importante la presencia de bacterias ácido-lácticas (BAL, como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*) que crece rápidamente durante la fermentación (10^8 - 10^9 u.f.c./g) y se mantiene prácticamente estables hasta el final del secado. Esta microbiota juega un papel esencial en la calidad de los productos

fermentados. A través de la acidificación del medio contribuye a la estabilización del color y mejora de la textura (Ordóñez *et al.*, 1999). Además, inhibe el desarrollo de la microbiota acompañante que normalmente llega a la masa del embutido procedente de la materia prima o en el transcurso de la fabricación (Fernández *et al.*, 2000). La presencia o la adición de cultivos iniciadores que contengan además bacterias pertenecientes a la familia *Micrococcaceae* (*Kocuria varians*, *Staphylococcus carnosus* y *Xylosus*) es muy importante por su actividad nitrato reductasa que es la responsable de la reducción del nitrato a nitrito, contribuye a la reducción del nitrito residual y poseen actividad catalasa para la protección del color y prevención de la rancidez. Los mohos (*Penicillium*) que se añaden sobre la superficie de la tripa de los embutidos metabolizan los ácidos orgánicos y ejercen desaminación oxidativa de los aminoácidos produciendo amonio que eleva el pH de los embutidos y potencia el aroma y sabor típicos (Ordóñez *et al.*, 1999).

En el proceso de elaboración de embutidos, las especias, los aditivos, el azúcar y la sal suelen agregarse a la masa básica de carne y grasa picadas y la mezcla obtenida se homogeneiza para distribuir adecuadamente estos componentes. En caso de que se utilicen cultivos iniciadores, se añaden al final del proceso, cuando el resto de ingredientes forman ya una masa uniforme. Tras su adición se continúa con el amasado para que la distribución de los microorganismos sea homogénea en toda la mezcla. La masa cárnica ya elaborada se deja reposar en refrigeración durante 18-24 horas, después de lo cual se embute.

I.4.4.3.3. Embutido

Tras mezclar todos los ingredientes, se procede a embutir o introducir la masa en las tripas para constituir las piezas del producto cárnico. Las tripas pueden ser naturales o artificiales. Las tripas naturales se han utilizado tradicionalmente empleando tracto intestinal de ovino, porcino y vacuno. Sin embargo, el proceso de obtención y preparación de la tripa es muy laborioso por lo que son más costosas que las artificiales y generalmente sólo se utilizan para productos de mayor calidad como el lomo embutido. Las tripas artificiales de celulosa o colágeno son las más empleadas.

Para llevar a cabo esta operación, la industria suele utilizar embutidoras continuas a vacío que evitan la presencia de aire en la masa, reduciendo considerablemente la posibilidad de que aparezcan defectos de aspecto y consistencia en el producto. Durante la operación de embutido es recomendable que la temperatura de la masa cárnica no sea superior a 1 o 2 °C para evitar fenómenos de embarrado, es decir, un desprendimiento excesivo de grasa por rotura de adipocitos, lo cual confiere a la pasta un aspecto pálido y grasiento.

I.4.4.3.4. Fermentación

Los embutidos se cuelgan a continuación en cámaras expuestos al aire con o sin sistemas de control de la temperatura y humedad relativa (HR). En este proceso, la temperatura puede variar entre 12 y 25 °C, y la HR se mantiene en el intervalo 90-95% durante un periodo de tiempo que puede oscilar entre 24 y 72 horas.

La microbiota inicial, sin considerar la adición de cultivos iniciadores, suele ser muy variada y similar a la presente en la carne fresca, incluyendo lactobacilos, micrococcos, enterobacterias, *Pseudomonas* spp, *Achromobacter* spp., *Flavobacterium* spp, *Bacillus* spp., etc., hongos y levaduras (Ordoñez *et al.*, 1999). Sin embargo, la conjunción de diversos factores como la adición de las sales del curado, la reducción de la a_w , los efectos inhibitorios de nitratos y la baja tensión de oxígeno, favorece el establecimiento de las condiciones óptimas para la inhibición del crecimiento de microorganismos alterantes (*psedomonas* principalmente) y favorece el desarrollo de los deseables, de manera que en los embutidos elaborados de forma tradicional, sin adición de cultivos iniciadores, la microbiota típica está constituida por BAL y *Micrococcaceae* (Ordoñez *et al.*, 1999).

Como se ha introducido en el apartado I.4.4.3.2.6., las BAL, especialmente el género *Lactobacillus*, son responsables de la producción de ácido láctico como producto de la fermentación de carbohidratos (Caplice & Fitzgerald, 1999). Se produce así un descenso del pH hasta valores próximos a 5,0, es decir, alrededor del punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares (Totosaus *et al.*, 2002), con la consiguiente reducción de la CRA de la masa y facilitándose el secado posterior. Además, se promueve la coagulación de las proteínas cárnicas que aportará firmeza al producto final (Ordoñez *et al.*, 1999).

Junto con la fermentación de azúcares, las proteínas miofibrilares, actina y miosina, empiezan a ser degradadas a péptidos, lo que se traduce en un aumento del nitrógeno no proteico. Las principales responsables de esta degradación son las proteasas musculares, fundamentalmente la catepsina D (Toldrá *et al.*, 1996). Al mismo tiempo, se inicia la hidrólisis lipídica o lipólisis, fenómeno que se debe tanto a la presencia de lipasas microbianas, como de lipasas endógenas de la carne (Ordoñez *et al.*, 1999).

I.4.4.3.5. Curado

Una vez finalizada la etapa de fermentación, los embutidos pasan por una etapa de curado, donde empieza el proceso de maduración y, simultáneamente, el secado del producto. Esta etapa implica el mantenimiento de los embutidos durante periodos de tiempo variables en condiciones de Hr y temperatura controladas (Chang *et al.*, 1996). Los procedimientos más habituales suelen consistir en 5-10 días a 18-22 °C y HR entre el 80-90% y, posteriormente, se mantienen a 12-15 °C y una HR del 65-80% (Ordóñez & de la Hoz, 2001). La duración de este último periodo del curado es variable, en función de la clase de producto y su diámetro, pero suele oscilar entre unos 15 (curado rápido) y 90 (proceso tradicional) días (Flores, 1997).

La deshidratación es un requisito esencial para conseguir la firmeza final de la masa del embutido. Tras la fermentación, la masa coagulada es todavía inestable y está debilitada por una capa intermedia de moléculas de agua. Para lograr la firmeza final de la masa, las moléculas de agua inmovilizadas en los espacios entre los agregados de proteínas deben liberarse (Chang *et al.*, 1996). Esto se consigue procurando la deshidratación progresiva del producto mediante el ajuste y control de las condiciones de secado de la cámara de maduración.

Paralelamente a la deshidratación se producen fenómenos asociados a la maduración del producto. La proteólisis, iniciada durante la fermentación, continúa ahora con la actuación de las exopeptidasas, tanto endógenas como de origen microbiano, que liberan pequeños péptidos y aminoácidos libres (Molly *et al.*, 1997). Además, la fracción de nitrógeno no proteico se enriquece con el amonio procedente del metabolismo microbiano de los aminoácidos (Ordóñez *et al.*, 1999), provocando un ligero aumento del pH. Este incremento en el nitrógeno no proteico y, en particular, en los aminoácidos

libres, contribuye, tanto al sabor y al aroma del producto final, como a su desecación, pues acelera la pérdida de agua (DeMasi *et al.*, 1990).

Por otra parte, la lipólisis también continúa en la fase de maduración. Los ácidos grasos libres generados sufren diversas actividades oxidativas que conducen a la aparición de sustancias volátiles y no volátiles que contribuyen al sabor y aroma del embutido. Por último, cabe destacar que, durante esta fase, tiene lugar la completa reducción del nitrito residual (Incze, 1992).

La producción de la amplia variedad de embutidos crudos curados fermentados que existe en el mercado es posible por la aplicación de una tecnología de fabricación flexible que permite modificaciones siempre que se mantengan las reducciones adecuadas de pH y a_w . Las diferencias se basan fundamentalmente en la realización de una fermentación más o menos rápida, en función de la adición o no de azúcares, el uso de cultivos iniciadores y algunos otros aditivos (Ordóñez *et al.*, 1999).

I.4.5. EVOLUCIÓN DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS DURANTE LA ETAPA DE SECADO-MADURACIÓN

Con independencia del producto cárnico considerado, durante la etapa de secado-maduración tiene lugar la estabilización de las piezas cárnicas. Tanto la oxidación lipídica como las reacciones proteolíticas y lipolíticas, entre otras, constituyen el conjunto de fenómenos madurativos que modifican la composición y determinan la calidad final del producto, dando como resultado las características sensoriales típicas y altamente apreciadas de los productos curados, como el jamón y los embutidos. Seguidamente se analizan brevemente los principales cambios que se producen durante la etapa de secado-maduración.

I.4.5.1. Parámetros fisicoquímicos

I.4.5.1.1. Humedad y actividad de agua

Como se ha mencionado, durante el proceso de elaboración de los productos curados se produce una progresiva disminución de su contenido acuoso y consecuentemente un descenso paralelo de la a_w , este último potenciado además por la absorción de las sales.

La pérdida de humedad se produce mediante un fenómeno de difusión del agua desde el interior del producto a la superficie y posterior evaporación superficial. Suele ser más notable en las etapas previas a la maduración, ya que las condiciones termohigrométricas van a ser más suaves a medida que avanza el proceso de elaboración. A ello se suma una superficie más seca del producto, lo que va a ocasionar que la pérdida de humedad sea menor durante las últimas etapas del procesado. Por otra parte, la pérdida de agua durante el secado tiene lugar a través de la superficie del producto de forma que el tiempo de secado estará directamente relacionado con la superficie que esté en contacto con el aire. En la velocidad de secado también intervienen otros factores como la humedad del aire exterior, la humedad del producto y la transmisión de calor, que será fundamental para que tenga lugar la evaporación del agua.

En cualquier caso, la velocidad de deshidratación debe adecuarse a las características del producto en las distintas etapas del proceso de elaboración (Prieto & Carballo, 1997) para evitar la aparición de defectos. Cuando es muy lenta, se incrementa el riesgo de proliferación microbiana en la superficie del producto, con la consiguiente aparición de limosidad y desarrollo de signos de putrefacción. Por el contrario, si la velocidad es muy rápida, se potencia la formación de una corteza superficial e impermeable al agua, que impedirá la salida de humedad desde el interior del producto, dando lugar a procesos de putrefacción profunda. Este fenómeno es conocido como *encostramiento* (Prieto & Carballo, 1997).

I.4.5.1.2. Desarrollo del color

El color de la carne depende de varios factores como son la concentración y la forma química de los pigmentos musculares, así como de la tasa de caída del pH y su valor final. En el caso de productos cárnicos curados, otro factor que influye en el desarrollo del color es la adición de sales nitrificantes durante el procesado.

Uno de los efectos más importantes que tiene el nitrito en los productos cárnicos crudos curados es la formación del color típico. Este proceso tiene lugar a través de una secuencia compleja de reacciones que conducen a la formación de nitrosomioglobina, que imparte el característico color rojo violáceo a estos productos (Figura I.33).

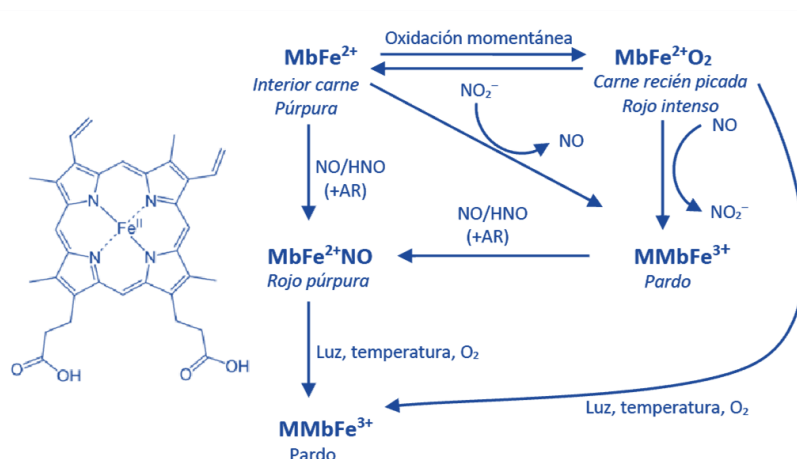


Figura I.33. Grupo hemo de la mioglobina (izquierda) y esquema de las reacciones del curado para la formación del color (derecha). $MbFe^{2+}$, mioglobina nativa; $MbFe^{2+}O_2$, oximioglobina; $MMbFe^{3+}$, metamioglobina; $MbFe^{2+}NO$, nitrosomioglobina; AR, agentes reductores. Adaptado de: Skibsted, 1992.

La molécula de mioglobina está constituida por una proteína, la globina, y un grupo hemo formado por cuatro anillos de pirrol y un núcleo de hierro central, cuya función es la de contener el oxígeno. Este hierro se une, por cuatro enlaces, a los átomos de nitrógeno de los anillos pirrólicos; la posición quinta está unida al átomo de nitrógeno del grupo imidazol de la globina y, la sexta posición de coordinación queda lista para unirse a cualquier molécula (O_2 , CO , NO , etc.) que presente la configuración electrónica adecuada. La naturaleza de este sexto ligando y el estado de oxidación del hierro van a ser los que determinen el color de la carne.

Si la sexta posición de coordinación está vacía y el hierro aparece en forma reducida, el color de la carne será rojo púrpura (mioglobina); si está ocupada por oxígeno, la mioglobina estará oxigenada (oximioglobina) presentando un color rojo anaranjado, y si en la sexta posición se aloja el agua y el hierro se encuentra en estado férrico, la mioglobina está oxidada (metamioglobina), adquiriendo la carne un color pardo. La oximioglobina es el pigmento dominante en la superficie de la carne fresca, dada su exposición al oxígeno. Las sales de curado comerciales contienen, además de cloruro sódico, una mezcla de nitrito sódico y nitrato potásico que, tras la acción de microorganismos, se reducen dando lugar al compuesto activo, el óxido nítrico. Este compuesto se va a unir al grupo hemo de la mioglobina, dando lugar al pigmento responsable de la coloración típica de productos curados, la nitrosomioglobina (Honikel, 2008; Skibsted, 2011).

En general, la adición de tan solo 40-50 mg/kg de nitrito permite el correcto desarrollo del color en los productos curados (Froehlich *et al.*, 1983). Si no se adicionan nitratos y nitritos durante la elaboración de los productos cárnicos no tiene lugar la formación del pigmento característico (Pichner *et al.*, 2006).

I.4.5.2. Fracción proteica

Además de las modificaciones post-mortem que se producen en las proteínas de la carne, durante la etapa de maduración de productos cárnicos curados, las proteínas y los compuestos nitrogenados van a verse afectados por una serie de transformaciones, que van a tener como resultado un aumento progresivo de la fracción nitrogenada no proteica (NNP). Por ello, al inicio de la etapa de maduración, predominarán los péptidos, mientras que, los aminoácidos libres serán más abundantes al final del proceso. Este fenómeno, junto con la lipólisis, va a determinar las características de textura, sabor y aroma del derivado cárnico.

I.4.5.2.1. Evolución de las fracciones nitrogenadas

Tanto las proteínas sarcoplásmicas como las miofibrilares experimentan, durante la maduración de los productos cárnicos curados, un proceso de desnaturalización e hidrólisis, que se manifiesta en un descenso de la cantidad de proteína y un aumento de la concentración de nitrógeno no proteico (péptidos de diferentes tamaños, aminoácidos y otros compuestos de degradación) (Toldrá *et al.*, 1993; Córdoba *et al.*, 1994). En jamón Ibérico al final de la maduración, se han descrito tasas de transformación de nitrógeno proteico en nitrógeno no proteico del orden del 25 al 27% (Ventanas, 2001). La medida de este parámetro puede ser útil para determinar el grado de proteólisis del proceso.

La evolución del contenido y composición del NNP va a estar condicionada tanto por la variación de temperatura, como por el grado de secado del producto. El incremento de la concentración se verá favorecido en las fases en las que la temperatura sea mayor. Sin embargo, a la vez que el aumento de temperatura favorece la proteólisis, también va a favorecer la desecación del producto, circunstancia en la que se verá disminuida la actividad enzimática (Sánchez-Molinero & Arnau, 2010).

En la etapa inicial de maduración, el nitrógeno peptídico (NP) representará la mayor parte del NNP. Al aumentar la temperatura en la fase de secado, el contenido en NP aumentará más lentamente pues, en estas condiciones, se va a ver más favorecida la hidrólisis de péptidos hacia aminoácidos libres, que la propia generación de péptidos (Ordóñez *et al.*, 1999). Lo mismo ocurrirá en las últimas etapas, en las que la cantidad de NP puede llegar a disminuir al quedar inhibida la actividad de determinadas proteasas y, por lo tanto, los aminoácidos libres al final de la fase de maduración pueden llegar a sustituir a los péptidos como principal fracción del NNP (Toldrá, 2006). En esta etapa final, los aminoácidos libres lisina, alanina y ácido glutámico han sido descritos como aminoácidos mayoritarios de la fracción amininoacídica (NA) de productos cárnicos curados, como el jamón, al final del proceso de maduración (Jurado *et al.*, 2007).

I.4.5.2.2. Proteólisis

La proteólisis es un fenómeno de naturaleza enzimática, que consiste en la actuación sucesiva de distintas enzimas proteolíticas sobre las proteínas cárnicas (Figura I.34).



Figura I.34. Esquema general de la proteólisis en productos cárnicos curados (Toldrá, 2006).

Las principales enzimas musculares que se asocian con la hidrólisis de las proteínas son endoproteasas y exopeptidasas (Toldrá & Aristoy, 2010). A la acción hidrolítica de las enzimas musculares hay que sumar la actividad proteolítica de los microorganismos presentes en los productos curados, especialmente de las BAL. Aunque se desconoce el papel que las enzimas proteolíticas juegan en el desarrollo del flavor de los productos madurados, sí está claro que contribuyen a los cambios proteolíticos que suceden

durante la maduración, sobre todo durante los primeros días, cuando dichas bacterias hidrolizan proteínas a péptidos y aminoácidos para su utilización (Ordóñez *et al.*, 1999).

La primera etapa de la proteólisis consiste en la hidrólisis de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas por la acción de las endoproteasas musculares (calpaínas I y II, catepsinas B, B+L y H principalmente y, en menor medida, proteosoma o complejo endopeptidasa multicatalítico).

Las calpaínas son cisteína endopeptidasas de origen muscular. Están formadas por la calpaína I, la calpaína II y la calpastatina, proteína que inhibe de modo específico la actividad de las anteriores (Koomaraie, 1994). Estas enzimas sólo actúan en la carne cruda y en el primer estadio del periodo de maduración de productos cárnicos curados (Ordóñez & De la Hoz, 2001). Estas enzimas son muy inestables, perdiendo su actividad a los 10-14 días de procesado. Las calpaínas son capaces de hidrolizar proteínas como la titina, la nebulina, las troponinas T e I, la tropomiosina y la desmina (Koomaraie, 1994).

Las catepsinas, pertenecientes también al grupo de las endoproteasas musculares, son proteinasas ácidas lisosomales. Este grupo de enzimas son especialmente activas a pH ácido, provocando la liberación de fragmentos proteicos de tamaño intermedio procedentes, en gran medida, de la degradación de proteínas miofibrilares (fundamentalmente miosina y troponina). Las catepsinas van a ser las principales responsables de los cambios que van a tener lugar durante la maduración ya que, al contrario que las calpaínas, este grupo de enzimas son bastante estables a lo largo del proceso de curado. De hecho, se ha llegado a encontrar una actividad residual del 5%-10% de las catepsinas B, H y L, incluso después de 15 meses de procesado de jamones (Toldrá, 1998). Por otro lado, la actividad de la catepsina D tiende a desaparecer a partir del sexto mes de procesado. El resultado de la actividad de estas enzimas se traduce en una disminución de la capacidad de retención de agua, así como una serie de cambios en las características texturales y en el valor nutricional.

Las exopeptidasas (dipeptidilpeptidasa I, II, III y IV y tripeptidilpeptidasas I y II, carboxipeptidasas y alanil-, arginil-, metionil-leucil-, y piroglutamil- aminopeptidasas) actúan sobre los fragmentos proteicos, pequeños polipéptidos y péptidos obtenidos tras la acción de las endopeptidasas (especialmente catepsinas) sobre las proteínas

miofibrilares y sarcoplásmicas (Toldrá, 1998). Las exopeptidasas hidrolizan estas cadenas peptídicas a partir de sus extremos terminales (Toldrá, 1998; Toldrá, 2006). Estas enzimas son las responsables de la generación de di y tripéptidos, mientras que las aminopeptidasas y carboxipeptidasas liberan aminoácidos libres. Por lo tanto, la mayor parte de los aminoácidos libres que se generan durante el procesado del jamón curado son resultado de la acción de las aminopeptidasas (Toldrá, 1998). Se ha observado que la actividad de las aminopeptidasas musculares, incluyendo la alanil, arginil, leucil, tirosil y piroglutamil aminopeptidasas, es estable durante los 8 primeros meses de curado, disminuyendo al final del proceso, debido al efecto inhibidor de la sal, la desecación y la propia actividad proteolítica (Toldrá *et al.*, 1996). Las principales aminopeptidasas son la alanil aminopeptidasa (responsable de más del 80% de la actividad total de aminopeptidasas) y la metionil aminopeptidasa, que presentan amplia especificidad por los sustratos, y la arginil aminopeptidasa que hidroliza principalmente aminoácidos básicos (Flores *et al.*, 1996).

Estos aminoácidos liberados son la base para el desarrollo de distintas vías de reacciones químicas (reacción de Maillard y/o degradación de Strecker), con gran relevancia para la generación de las características sensoriales del producto, tanto a nivel del aroma (como compuestos precursores) como del sabor. Los principales aminoácidos relacionados con las características sensoriales de productos sometidos a largos tiempos de curado, como el jamón, son ácido glutámico, alanina, leucina, lisina valina y ácido aspártico (Toldrá, 1998). Según qué aminoácidos predominen, el sabor será más dulce, amargo o salado.

Todo este proceso de hidrólisis proteica y liberación de aminoácidos va a estar regulado por parámetros extrínsecos como el grado de secado, la temperatura, la cantidad de sal del músculo y el pH (Toldrá, 1998). No obstante, la temperatura es el factor que más influye en la regulación de la proteólisis. Así, el aumento de temperatura a lo largo del proceso de elaboración producirá un incremento de la proteólisis, al aumentar la actividad de las enzimas proteolíticas (Ordóñez & de la Hoz, 2001). Respecto a la cantidad de sal, cuando la concentración es baja, las enzimas pueden actuar, y la proteólisis estará favorecida mientras que, en etapas posteriores de curado, debido a

un aumento en su concentración tras la incorporación de sales, la actividad proteolítica disminuirá (Antequera & Martín, 2001).

I.4.5.3. Fracción lipídica

De forma general, se puede afirmar que los lípidos de los productos crudos-curados son precursores de muchas sustancias aromáticas, que se forman como resultado de fenómenos lipolíticos y oxidativos, durante el proceso de maduración, que van a tener un importante papel en el desarrollo de las características sensoriales finales (Ordóñez *et al.*, 1999).

I.4.5.3.1. Lipólisis

La lipólisis consiste en la hidrólisis enzimática de los lípidos musculares o del tejido adiposo y tiene como resultado la generación de ácidos grasos libres. Las enzimas lipolíticas, tales como lipasas, esterasas, fosfolipasas y lisofosfolipasas, están involucrados en los procesos de esta naturaleza que tienen lugar durante la maduración de la carne y de los productos cárnicos (Ordóñez *et al.*, 1999).

Pueden distinguirse dos tipos de lipólisis, según los lípidos afectados estén localizados en el interior del músculo o en el tejido adiposo. La grasa muscular se compone esencialmente de triglicéridos y fosfolípidos. En la lipólisis muscular, estos compuestos son los sustratos de las lipasas (ácida lisosomal, neutra y básica) y las fosfolipasas (tipo A1, A2, C y D), que reaccionan de forma hidrolítica (Figura I.35) liberando ácidos grasos de estas moléculas (Motilva *et al.*, 1993).

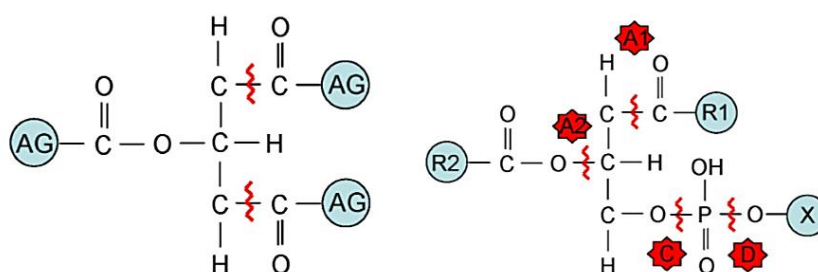


Figura I.35. Mecanismo de acción de las lipasas (izquierda) y las fosfolipasas (derecha) musculares (Mora, 2010).

El resultado final de la acción de ambos grupos de enzimas es la generación de numerosos ácidos grasos libres que, en productos como el jamón, aumentan el

contenido de ácidos grasos libres desde un 2% del contenido lipídico total en el estado inicial, a un 8%-20%, al final de su maduración (Gandemer, 2002). La actividad de las lipasas neutra y básica es más importante durante los primeros 3-4 meses del proceso de elaboración. Posteriormente, su actividad disminuye de forma progresiva, aunque la lipasa ácida ejerce una baja actividad a lo largo de todo el procesado (Gandemer, 2002).

En el caso del tejido adiposo, la grasa está compuesta en un 99% de triglicéridos, sobre los que actúa la lipasa sensible a hormonas. Esta enzima es la principal enzima responsable de la liberación de ácidos grasos a partir de los lípidos presentes en este tejido. Su actividad se va a desarrollar principalmente durante los primeros 8-10 meses de curado (Mora, 2010).

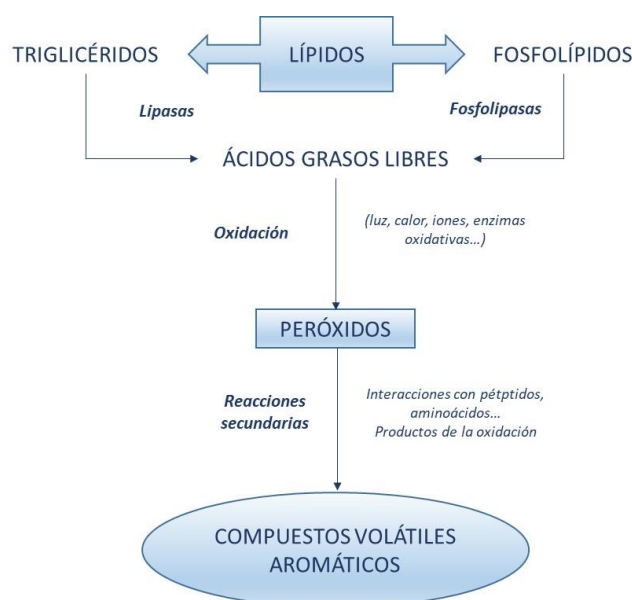


Figura I.36. Principales pasos en la lipólisis y oxidación lipídica (Toldrá, 1998).

I.4.5.3.2. Oxidación lipídica

Puede afirmarse que, la oxidación de lípidos tiene su inicio en la hidrólisis enzimática, descrita en el apartado anterior (Figura I.36).

Los ácidos grasos que se liberan durante la fase de maduración de los productos curados van a ser muy susceptibles de ser oxidados (Estévez *et al.*, 2009), dando lugar a diversos compuestos derivados de la oxidación (hidroperóxidos, epóxidos, furanos, etc.), que actúan como precursores de un gran número de compuestos volátiles (Toldrá,

1998). Estos compuestos determinarán, en gran medida, el aroma de los productos cárnicos elaborados (Toldrá & Aristoy, 2010).

La susceptibilidad a la oxidación de los ácidos grasos incrementa con el número de dobles enlaces, siendo el conjunto de ácidos grasos poliinsaturados los más propensos a sufrir reacciones de oxidación (Nawar, 1996). Esto se ha visto reflejado en diversos estudios como el firmado por Martín *et al.* (1999) en jamón Ibérico, donde se describe un aumento de ácidos grasos saturados libres, y un descenso del contenido en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados durante el procesado. Sin embargo, en otros trabajos (Andrés *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2009), la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados no fue tan evidente, y sólo se describe un aumento de estos compuestos insaturados al final de la maduración. Estas diferencias pueden ser explicadas por las numerosas variables que influyen en los procesos de oxidación lipídica, favoreciéndola o inhibiéndola. Por un lado, la presencia de antioxidantes naturales, procedentes de la alimentación del animal (vitamina E y tocoferoles), o los incorporados durante el proceso de elaboración (nitrito), inhibirán, en cierta medida, la reacción de oxidación de ácidos grasos. Por otra parte, también hay que considerar el efecto de diversos factores como el cloruro sódico, la luz o la presencia de determinados metales, que por el contrario la favorecen (Morrissey *et al.*, 1998).

El conjunto de compuestos que más interés presenta en la degradación lipídica, desde el punto de vista del desarrollo de componentes aromáticos, son los aldehídos, debido a su repercusión sobre el flavor del producto final (Ordóñez & de la Hoz, 2001). Se han identificado más de 100 compuestos volátiles en productos curados de cerdo procedentes tanto de lípidos como de proteínas. (Gandemer, 2002). La Tabla I.4 recoge los principales aldehídos lineales formados a partir de la oxidación de los ácidos grasos insaturados oleico (C18:1), linoleico (C18:3) y linolénico (C18:3).

Tabla I.4. Productos específicos de la degradación de los ácidos oleico, linoleico y linolénico (Ordóñez y de la Hoz, 2001)

Ácido graso	Grupo metileno atacado ^(a)	Hidroperóxidos isómeros	Aldehídos formados por descomposición de hidroperóxidos
Oleico	11	11-hidroperoxi-9-eno	Octanal
		9-hidroperoxi-10-eno	2-Decenal
	8	8-hidroperoxi-9-eno	2-Undecenal
		10-hidroperoxi-8-eno	Nonanal
Linoleico	11	13-hidroperoxi-9,11-dieno	Hexanal
		11-hidroperoxi-9,11-dieno	2-Octenal
		9-hidroperoxi-10,12-dieno	2,4-Decadienal
Linolénico	14	16-hidroperoxi-9,12,14-trieno	Propanal
		14-hidroperoxi-9,12,15-trieno	2-Pentenal
		12-hidroperoxi-9,12,15-trieno	2,4-Heptadienal
		13-hidroperoxi-9,11,15-trieno	3-Hexenal
	11	11-hidroperoxi-9,11,15-trieno	2,5-Octadienal
		9-hidroperoxi-10,12,15-trieno	2,4,7-Decatrienal
(a) Sólo se consideran los grupos metileno más activos			

Como hemos visto a lo largo de los apartados anteriores, la producción de derivados cárnicos crudos curados implica la combinación de una gran variedad de procesos y transformaciones de cuyo desarrollo exitoso dependerá la calidad del producto final. En la industria actual, la fiabilidad y la exactitud son aspectos cruciales para recortar costes y aumentar la productividad y calidad. El empleo de nuevas técnicas analíticas, como la resonancia magnética, brinda una importante herramienta de monitorización y control de los procesos de producción y trabajo en planta. Así, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha utilizado esta técnica para:

- i. monitorizar procesos de elaboración tradicionales, tanto de jamón curado como de embutidos crudos curados, evaluando, entre otros aspectos, la dinámica de secado y deshidratación y la transformación estructural de la matriz proteica de este tipo de miosistemas, pasando por el estudio de la movilidad y distribución de agua y grasa en el músculo y por la degradación proteica;
- ii. observar cambios en los metabolitos más significativos de los citados productos durante las etapas más destacadas de su elaboración a través del estudio del perfil metabólico característico de cada fase, identificando, entre otros, fenómenos de proteólisis, lipólisis y glucólisis, enfocado al control de procesos y a garantizar la calidad del producto final, y
- iii. evaluar la aptitud de los exudados cárnicos como nueva matriz no destructiva de estudio, así como estimar la conservación de derivados cárnicos mediante la aplicación de tratamientos de irradiación, a través del análisis del perfil metabólico de exudados de cerdo.

Por todo ello, los resultados aquí obtenidos constituyen interesantes aportaciones a la Tecnología Alimentaria, ahondan en el potencial de las técnicas basadas en la resonancia magnética para el análisis de alimentos, y afianzan la importancia de estas herramientas en el ámbito industrial.

II. Objetivos

España es uno de los países con una tradición más rica en la elaboración y consumo de los más variados embutidos y jamones. Lo diverso de la producción, que se extiende a todos los rincones de nuestro país, forma parte de nuestro acervo cultural y gastronómico, y es apreciada dentro y fuera de nuestras fronteras.

En la presente Tesis Doctoral se abordan dos líneas de trabajo. Por una parte, se ha estudiado el proceso de maduración de distintos productos derivados del cerdo blanco, elaborados a partir de pieza entera (jamón curado) y elaborados a partir de carne picada (modelos cárnicos y embutidos crudos curados) desde un punto de vista estructural. Para ello se ha empleado la Imagen de Resonancia Magnética (IRM), con el fin de estudiar los cambios en la macroestructura asociados al proceso, y la relaxometría T_2 de RMN, para estudiar la microestructura de los derivados cárnicos. Por otra parte, el proceso de maduración de los mencionados derivados se ha estudiado también desde un punto de vista bioquímico mediante la espectroscopía de ^1H de alta resolución, que permite la identificación y cuantificación de metabolitos representativos. Además, esta técnica se ha empleado también para valorar la aptitud de los exudados liberados a partir de la carne de cerdo como nueva matriz de análisis para estudiar los procesos y los cambios metabólicos que tienen lugar durante la aplicación de un tratamiento de electrones acelerados de la carne fresca de cerdo. Para afrontar las dos líneas de trabajo, se plantean dos objetivos principales:

El objetivo principal del estudio estructural fue evaluar el potencial de las técnicas no destructivas de RMN para monitorizar el proceso de maduración de distintos productos cárnicos curados a través de los cambios macro y microestructurales experimentados por los citados miosistemas durante su elaboración.

Para abordar este objetivo general de esta parte de la Tesis Doctoral se han considerado los siguientes objetivos parciales:

- Estudiar los cambios en la macroestructura de jamón curado durante la maduración mediante la Imagen de Resonancia Magnética (IRM), así como determinar su potencial como herramienta predictiva para la estimación de parámetros fisicoquímicos y características de textura.

- Estudiar los cambios en la microestructura de jamón curado durante la maduración a partir de las distribuciones continuas del tiempo de relajación transversal T_2 calculados mediante relaxometría de RMN.
- Determinar el potencial de la relaxometría T_2 de RMN para evaluar el efecto de la adición de proteasas sobre la microestructura de modelos cárnicos madurados.
- Monitorizar mediante la relaxometría T_2 de RMN el proceso de maduración de embutidos crudos curados (chorizo y salchichón) y evaluar su potencial como herramienta predictiva para la estimación de parámetros fisicoquímicos y características de textura.

El objetivo principal del análisis bioquímico fue valorar la aptitud de la espectroscopía de ^1H de RMN de alta resolución para monitorizar, desde un punto de vista bioquímico, los procesos de maduración de los derivados cárnicos y evaluar el potencial de esta técnica para el análisis de una matriz líquida procedente de la carne, el exudado cárnico.

Para abordar este objetivo general de esta parte de la Tesis Doctoral se han considerado los siguientes objetivos parciales:

- Determinar el potencial de la espectroscopía ^1H RMN HRMAS para el análisis y seguimiento del proceso de maduración de jamón curado y embutidos crudos curados, tipo salchichón, y realizar un estudio metabonómico para la discriminación de muestras en función del tiempo de maduración.
- Determinar el perfil metabólico de los exudados de cerdo y compararlo con el perfil obtenido para el músculo cárnico, con el fin de asegurar la aptitud de los exudados como matriz de estudio.
- Determinar el potencial de la espectroscopía ^1H RMN HRMAS para el análisis y seguimiento del proceso de conservación de la carne de cerdo tratada con electrones acelerados, mediante el análisis del exudado cárnico liberado.
- Estimar el potencial de las técnicas quimiométricas basadas en la RMN para la clasificación de exudado de carne de cerdo en función de la dosis de irradiación y del tiempo de almacenamiento.

En conjunto, se estima que se han abordado objetivos de interés científico y tecnológico, especialmente mediante la optimización de técnicas de RMN para el estudio de productos madurados y la estimación de su potencial de aplicación, como técnicas no destructivas, a nivel industrial.

III. Material y métodos

*En este apartado se aporta una visión resumida y general de **las características de los materiales** empleados y de las **técnicas metodológicas** utilizadas en el conjunto de las actividades llevadas a cabo para concluir la presente Tesis Doctoral. No obstante, en cada artículo incluido (ver Sección IV. Resultados) se concretan y se aportan detalles específicos de la forma de proceder en las distintas experiencias desarrolladas.*

III.1. MATERIALES DE LABORATORIO

III.1.1. REACTIVOS Y DISOLVENTES

Todos los productos químicos utilizados en las experiencias integradas en la presente Tesis Doctoral fueron de la calidad de análisis apropiada en cada caso, suministrados por las marcas *Merck*, *Panreac*, *Fluka* y *Sigma-Aldrich*.

III.1.2. MATERIAL INSTRUMENTAL

- El material de vidrio utilizado en el trabajo experimental escrito en esta memoria fue de la marca *Pyrex*® (vasos de precipitados, pipetas de vidrio, probetas, matraces Erlenmeyer, tubos de centrífuga, tubos Kjeldahl, etc).
- El instrumental empleado (cucharas, espátulas, tijeras bisturí) fue de acero inoxidable.
- Las pipetas automáticas empleadas fueron de la marca *Discovery Comfort* autoclavable HTTP con capacidad de 20-200 µL, 100-1000 µL y 1-5 mL.
- El calibre utilizado para medir las dimensiones de las probetas de ensayo para los ensayos reológicos fue un pie de rey digital *Tesa* (modelo Shop-Cal) con accesorios *Brown and Sharpe Centerline*.
- Los desecadores para la conservación de muestras, con gel de sílice activado, fueron de la marca *Pyrex*®.
- Los procedimientos de filtración se realizaron utilizando filtros *Whatman 125* y *Millipore FH 0,5 µm*.
- Las muestras cárnicas, así como las disoluciones y preparados sensibles a la temperatura, se conservaron en arcones de congelación *Liebher* y en frigoríficos *Sanyo*, *Medicool*, *Philco*, *Fagor*, *Electrolux* y *Kelvinator*.
- Las disoluciones se prepararon en placas de agitación magnética *Selecta* (modelo Agimatic N), *Bunsen* (modelo MC-8) y *Thermolyne* (modelo Nuova II), dotadas con regulador de temperatura.

- Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monoplato *AND* (modelo FX-320) y *KERN* (modelo 440-33 y modelo 449-35N) y las de precisión en balanza analítica *AND* (modelo HR-120).
- La homogeneización de las muestras, para la realización de las correspondientes determinaciones químicas, se efectuó en homogeneizadores *Polytron* (modelo PT 10-35) y *Ultra Turrax* (modelo T25 basic).
- La concentración de volúmenes de disolventes orgánicos se realizó en un rotavapor *Büchi* (modelo EL), acoplado a un baño calefactor y a una bomba de vacío *Eyela* (modelo A-3S). Los volúmenes pequeños se evaporaron mediante corriente de nitrógeno (suministrado por *Carbueros Metálicos, Grupo Air Products*).
- La centrifugación de extractos se realizó en centrífugas *Sorvall* (modelo RC-5B) equipadas con rotores modelo GSA, GS3 y S600, y Orto-Alresa (modelo Digicen 20).
- El agua destilada se obtuvo en un aparato *Millipore Elix 3*, por ósmosis inversa. Fue agua purificada de tipo II, de calidad constante y fiable, con una resistividad del orden de 15 MΩ.

III.2. MATERIAL CÁRNICO

III.2.1. PERNILES Y JAMONES EN DISTINTAS ETAPAS DE CURADO

Los pernils frescos (10-11 kg), así como las piezas de jamón en distintas etapas del proceso de curado, analizados en este estudio fueron suministrados por la empresa cárnica *Incarlopsa* (Tarancón, Cuenca). Todas las piezas procedían de hembras de cerdos blancos grasos (Landrace × Large White) habitualmente utilizados para la elaboración de jamón curado en la mencionada industria. El procedimiento seguido, así como los momentos de toma de muestra (pernil fresco, salado, postsalado, seco y bodega), y las determinaciones físicoquímicas realizadas se resumen en la Figura III.1.

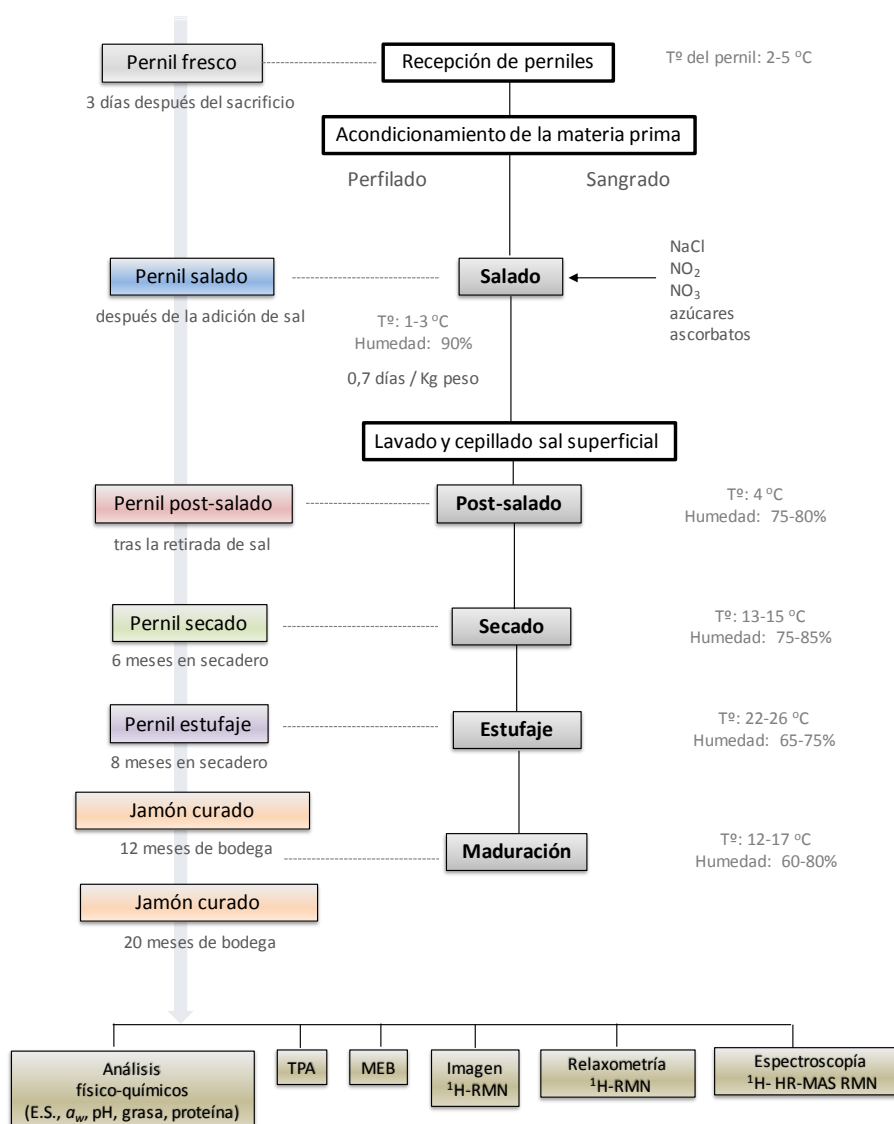


Figura III.1. Principales etapas de la elaboración de jamón curado y análisis realizados. TPA: Análisis del Perfil de Textura, ES: Extracto seco, MEB: Microscopía Electrónica de Barrido.

Tras la recepción de las piezas en los tiempos establecidos, se procedió, en la planta piloto de la Facultad de Veterinaria de la UCM, a su disección anatómica para el aislamiento y extracción manual de los tres músculos objeto de estudio: bíceps femoral, semimembranoso y semitendinoso (Figura III.2). Las muestras se mantuvieron en refrigeración (4 ± 1 °C) hasta su análisis.

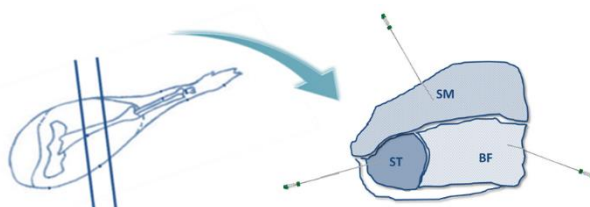


Figura III.2. Localización anatómica de los músculos estudiados y procedimiento seguido para la toma de muestras. SM:semimembranoso. BF: bíceps femoral; ST: semitendinoso.

III.2.2. MODELOS CÁRNICOS Y EMBUTIDOS CRUDOS CURADOS

Para las experiencias realizadas en esta Tesis Doctoral se elaboraron modelos cárnicos en la planta piloto de la Facultad de Veterinaria. Además, siguiendo formulaciones de productos comerciales, se elaboraron embutidos crudos curados.

Utilizando como base carne magra (*Longissimus lumborum*) molida en una picadora dotada de una placa de control de granulometría con orificios de 5 mm, se confeccionaron dos tipos de modelos cárnicos:

- i. SMS (sistema modelo sin enzimas adicionadas) elaborado mezclando (% p/p) con la mencionada carne picada, grasa (19%), sales de curado [NaCl (2,5%), KNO₃ (0,02%), NaNO₂ (0,01%)], dextrosa (0,8%), lactosa (1%) y dextrina (1,6%).
- ii. SMS+P (sistema modelo adicionado con proteasas), elaborado como el modelo anterior pero caracterizado por la adición de un combinado de proteasas. Se utilizó pronasa E de *Streptomyces griseus* y aspartil proteinasa de *Aspergillus oryzae* (300 y 100 U / Kg de carne, respectivamente). Las mencionadas proteasas fueron suministradas por Sygma-Aldrich. Los detalles de la elaboración de los dos modelos cárnicos se recogen en la Figura III.3.

Como embutidos crudos curados, se elaboró salchichón (S) y chorizo (CH) siguiendo un procedimiento tradicional, sin utilizar cultivos iniciadores (Ordóñez et al. 1999;

Toldrá et al., 2015). Para la fabricación de dichos productos se utilizaron dos niveles de grasa: 20% (1) y 40% (2), de manera que se fabricaron cuatro lotes de productos: S1, S2, CH1 y CH2. El esquema de elaboración de estos productos se recoge en la Figura III.4.

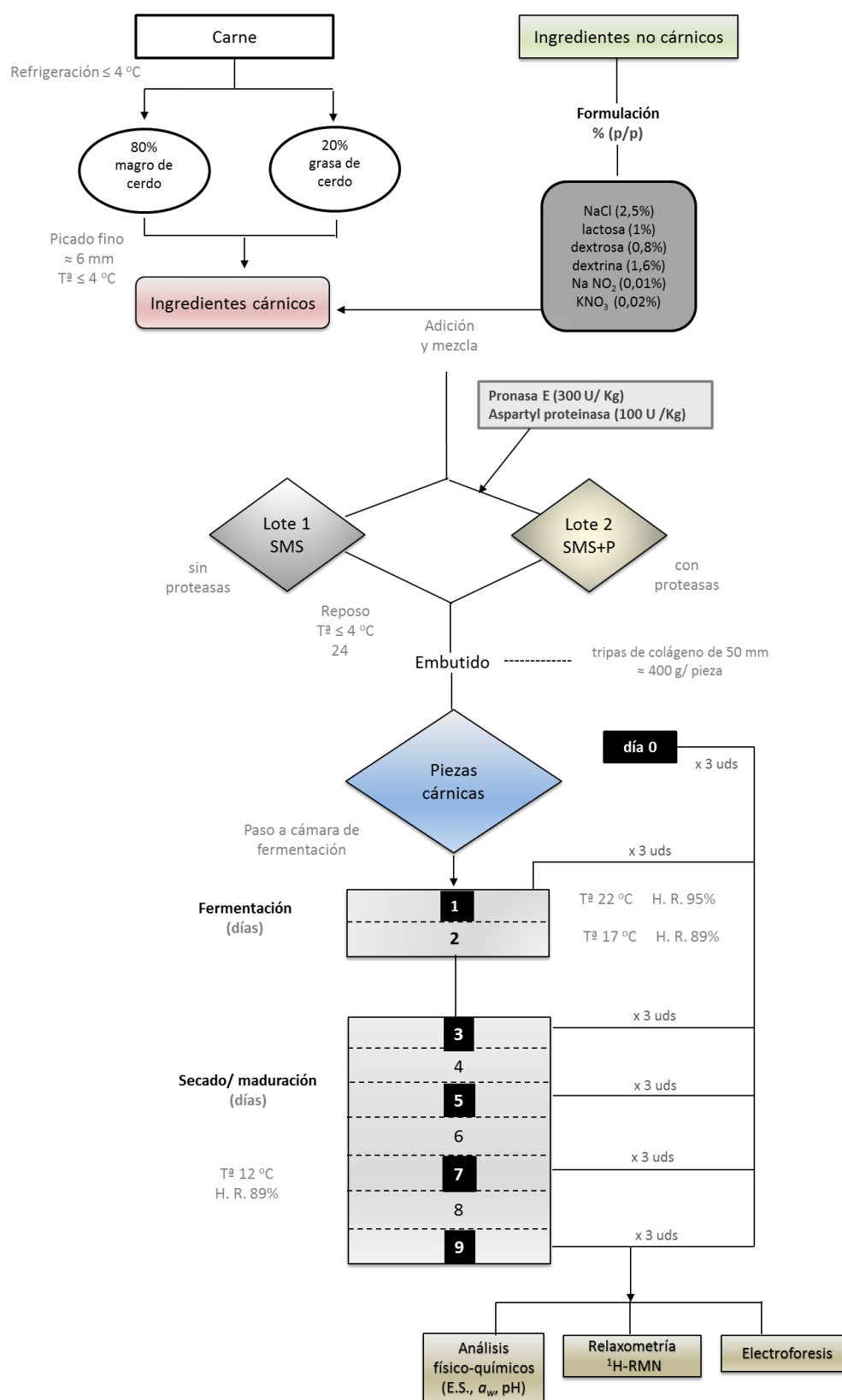


Figura III.3. Diagrama de elaboración de modelos cárnicos, toma de muestras y análisis.

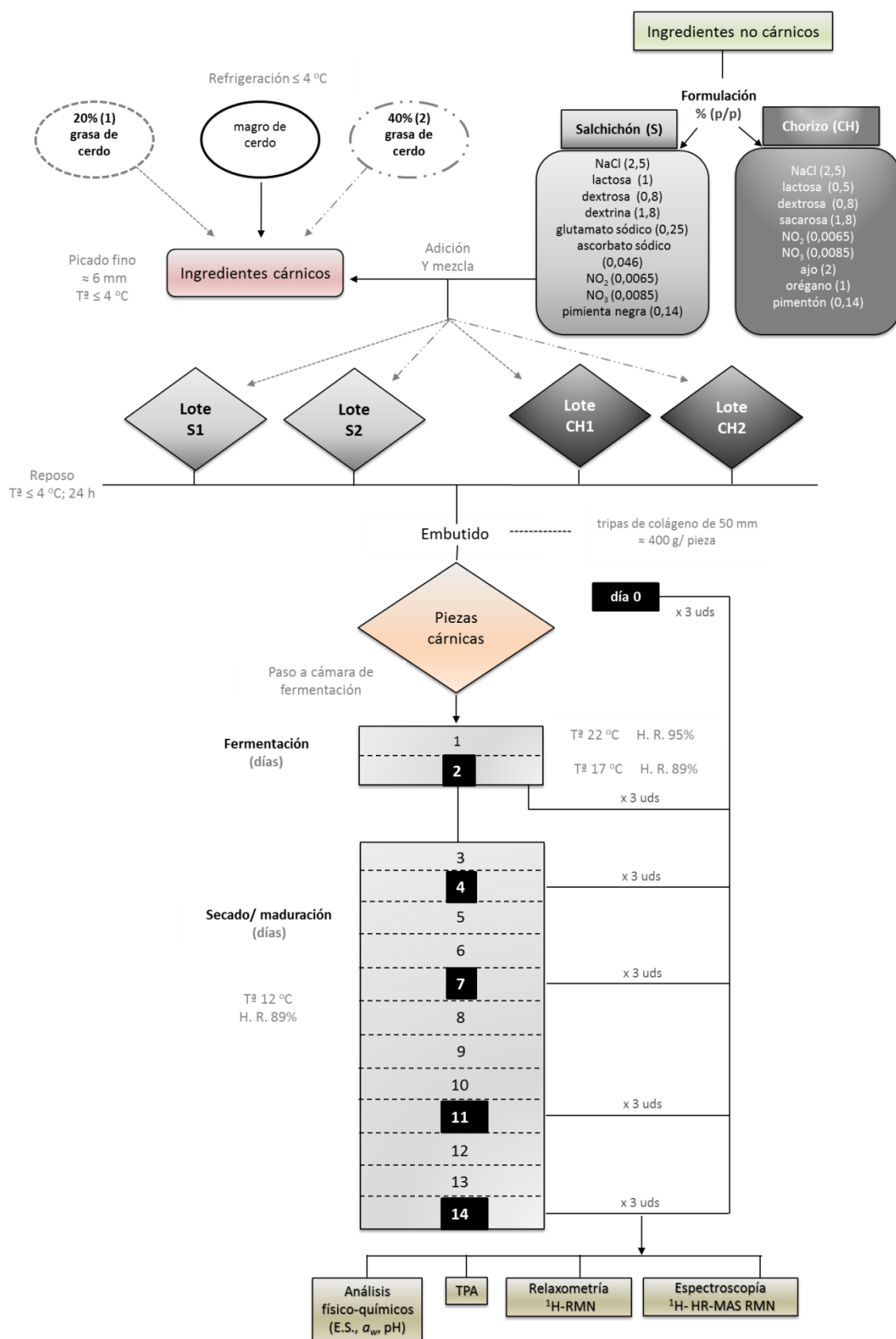


Figura III.4. Diagrama de elaboración de embutidos curados, toma de muestras y análisis.

III.2.3. EXUDADOS CÁRNICOS

En dos establecimientos comerciales se adquirieron porciones de lomo (*Longissimus dorsi*) de cerdo, procedentes de un total de seis animales. Las piezas cárnicas se transportaron (menos de 1 hora) a los laboratorios de la Sección Departamental de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria (UCM), en contenedores aislados térmicamente, donde se cortaron en porciones aproximadamente de 20 g. Para emular las condiciones de envasado comerciales, cada porción se envasó al vacío (20 kPa) en bolsas (10 × 10 cm) de plástico laminado (90 µm de poliamida / polietileno) de baja permeabilidad a los gases (velocidades de transmisión de $35 \text{ cm}^3 \text{ 24h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ bar}^{-1}$ y $150 \text{ cm}^3 \text{ 24h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ bar}^{-1}$ para O_2 y CO_2 , respectivamente). Las muestras se mantuvieron en refrigeración ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) hasta su tratamiento con electrones acelerados (radiación β) en la planta Ionisos Ibérica S.A. situada en Tarancón (Cuenca), dotada de un acelerador de electrones (Rhodotron TT200 (IBA Industrial, Lovain-Neuve, Belgium) que opera a 10 MeV, con una potencia máxima de 80kW. El transporte de las muestras hasta estas instalaciones (alrededor de una hora) se realizó en recipientes isotermos de polipropileno expandido. Las muestras se sometieron a dosis de 1, 2 y 6 kGy, considerando los resultados obtenidos en trabajos anteriores en los que se estimó el tratamiento requerido para incrementar la vida útil de la carne de porcino con el mínimo impacto en la calidad sensorial de la carne (García-Márquez et al., 2012). La dosis exacta absorbida por las muestras se comprobó determinando la absorbancia de dosímetros de triacetato de celulosa (CTA-125, Fuji, Japan) irradiados simultáneamente (ASTM, 2000). Las muestras no tratadas se usaron como control (0 kGy). Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (20-24 °C) por triplicado. El aumento de temperatura durante el tratamiento fue inferior a 2 °C. Después del tratamiento de ionización, las muestras se transportaron hasta el laboratorio, en los recipientes isotermos citados anteriormente, y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis. Después de 1, 6 y 12 días de almacenamiento, el exudado liberado por la carne envasada al vacío (veinticuatro muestras por tiempo de almacenamiento), se extrajo con ayuda de una pipeta y se congeló a -80 °C. Seguidamente se procedió a su liofilización (Virtris FM12XL, Milán, Italia) a temperatura ambiente. Los exudados liofilizados se almacenaron a -80 °C hasta el análisis por RMN.

En la Figura III.5 se resume el procedimiento conjunto descrito de extracción y manipulación de los exudados cárnicos.

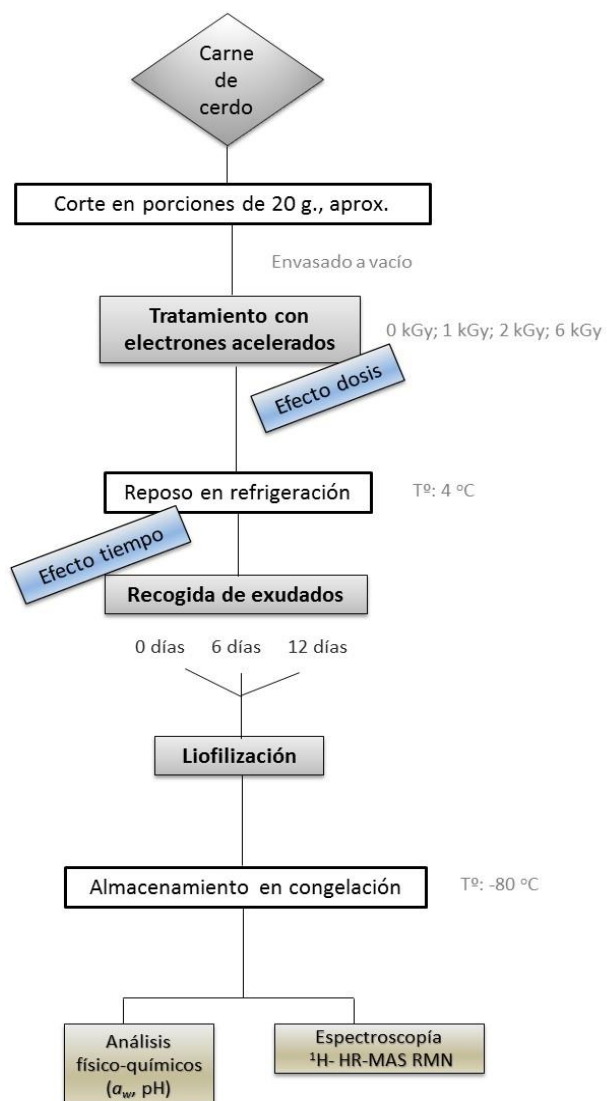


Figura III.5. Procedimiento de extracción y manipulación de exudados procedentes de carne de cerdo.

III.3. METODOLOGÍA

En la Figura II.6 se detalla gráficamente el planteamiento conjunto del trabajo integrado en la presente Tesis Doctoral, así como las experiencias que constituyen cada uno de los artículos o unidades publicables en los que se estructura.

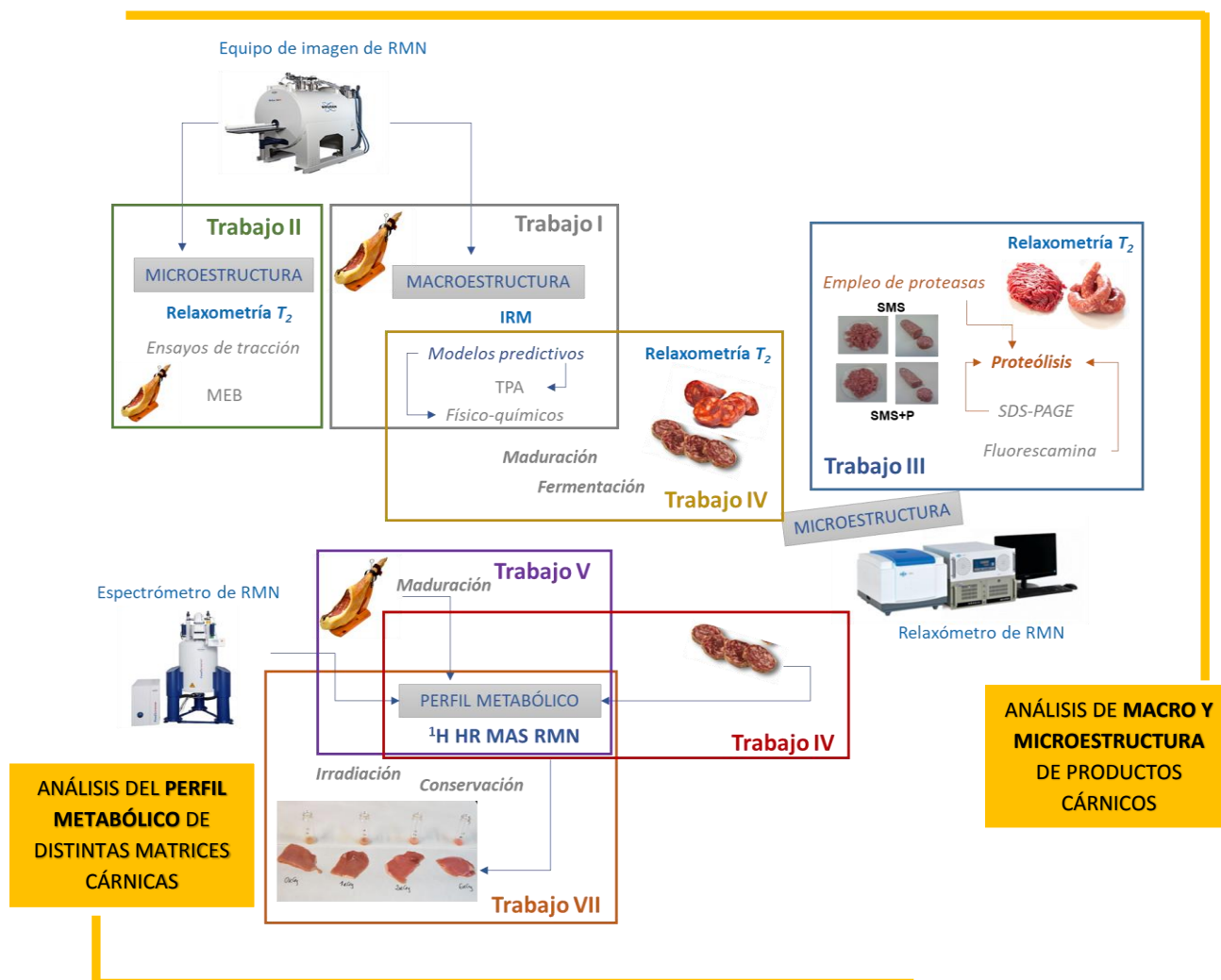


Figura III.6. Metodología y planteamiento del trabajo realizado.

III.4. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS

III.4.1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AGUA

La actividad de agua (a_w) se determinó utilizando un higrómetro de punto de rocío modelo *Decagon CX-1* a una temperatura de 20 °C. Para cada medida, en el equipo se introdujeron alrededor de 2 g de muestra en la cápsula suministrada por el fabricante. El equipo se calibró previamente (Labuza et al., 1976) con una disolución saturada de cloruro sódico ($a_w = 0,775$) y agua destilada ($a_w = 1,000$). El higrómetro proporcionó directamente los valores de la a_w (con una precisión de $\pm 0,003$ unidades) y la temperatura a la que se realizó la medida.

III.4.2. DETERMINACIÓN DEL pH

El pH se determinó por inmersión del electrodo en una solución homogeneizada de la muestra en agua destilada (1/10) (p/v), utilizando un pH-metro de la marca *Crison Digital 501*, modelo 2001. La calibración del pH-metro se realizó con las soluciones tampón de referencia, pH 4 y 7, suministradas por el fabricante. El electrodo se mantuvo sumergido en una solución de KCl 3M y AgCl para su correcta conservación.

III.4.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO ACUOSO

La determinación del contenido de agua se realizó según el procedimiento de la AOAC (2006), mediante secado de la muestra hasta peso constante. Se utilizó para ello una estufa marca *Heraeus*, modelo T6200, y el secado se realizó a una temperatura de 110 °C. La uniformidad de peso se alcanzó a las 48-72 horas. Las cápsulas de porcelana *Pobel* empleadas para contener la muestra se deshidrataron previamente a 110 °C durante 3 horas y se dejaron enfriar en un desecador de vidrio a vacío, cargado con gel de sílice activado. En las cápsulas se depositaron 4 g de muestra, aproximadamente, para cada determinación. El contenido de agua se determinó por diferencia entre el peso de la muestra fresca y el de la muestra desecada, una vez alcanzado el peso constante. El extracto seco (ES) se calculó restando el contenido de agua del peso de la muestra cárnica.

III.4.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN CENIZAS

La cuantificación de cenizas, o contenido mineral total, se realizó siguiendo el procedimiento descrito por la AOAC (2006), introduciendo las cápsulas de porcelana con la muestra deshidratada en una mufla *Heraus*, modelo MR 170, a 550 °C hasta su completa incineración (48 horas, aproximadamente). La cantidad de cenizas se determinó por diferencia de pesada con respecto a la cápsula vacía, previamente tarada.

III.4.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN GRASA

La determinación del contenido en grasa se realizó utilizando el método de Bligh & Dyer (1959), mediante una extracción en frío con cloroformo y metanol en presencia del antioxidante butilhidroxitolueno (*BHT*) para, posteriormente, cuantificar de forma gravimétrica, según el procedimiento descrito por Hanson & Olley (1963).

Se homogeneizaron 20 g de muestra con una mezcla de metanol/cloroformo (40/20) (v/v), y una punta de espátula de *BHT* al 98% para evitar la oxidación durante el proceso. A continuación, se añadió cloroformo y suero fisiológico (20/20) (v/v) y se homogeneizó de nuevo. La mezcla resultante se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos a 21 °C y se separó en tres fases: la superior, fundamentalmente acuosa, la intermedia, proteica, y la inferior, la fase orgánica. Se extrajeron 20 mL de la fase orgánica con ayuda de una pipeta Pasteur y se filtraron a través de un algodón impregnado con cloroformo/metanol (2:1) y una punta de espátula de sulfato sódico anhidro para retener pequeños restos de agua que se pudieran haber arrastrado durante el proceso. Por último, para obtener la grasa, se evaporó el disolvente en un rotavapor.

El porcentaje de grasa de las muestras se estimó por diferencia de pesada:

$$\% \text{ grasa} = 100 \times 2 \times (P_g - P_v) / M$$

donde: M = peso de la muestra (g); P_g = peso del matraz después de evaporar el disolvente (g) y P_v = peso del matraz vacío (g).

III.4.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEÍNA

La cuantificación de la proteína se realizó mediante la determinación de nitrógeno total por el método de Kjeldahl (AOAC, 2006). Las muestras se trataron en un digestor *Büchi Digestion*, Unit K-435, acoplado a una bomba de vacío *Büchi*, encargada de recoger los gases producidos durante el proceso de digestión. La neutralización y destilación de las muestras digeridas se efectuó en un destilador automático, *Büchi Distillation*, Unit B-324. 1,5 g de muestra se introdujeron en un tubo Kjeldahl junto a una pastilla de 5 g de catalizador (99,9% de K_2SO_4 y 0,1% de Se), 3-4 perlas de vidrio y 20 mL de ácido sulfúrico al 96%. Se cargó el digestor con los tubos Kjeldahl, se cerró el circuito y se calentaron a 350-400 °C durante 4-5 horas, hasta que el contenido de los tubos adquirió un color amarillo claro y transparente. La destilación se realizó una vez los tubos se habían enfriado. Para ello se añadieron 45 mL de hidróxido de sodio (NaOH al 40% p/v). Cada destilado resultante se recogió en un matraz de Erlenmeyer con 25 mL de ácido bórico (H_3BO_3 al 4% p/v). La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realizó por medio de una volumetría ácido-base del ion borato formado, empleando ácido clorhídrico (HCl 0,5 N) y como indicador una mezcla de rojo de metilo (0,2%) y azul de metileno (0,1%) en etanol. Los equivalentes de ácido consumidos corresponden a los equivalentes de amoníaco destilados.

Para calcular el % de nitrógeno total se empleó la fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno total} = V_{HCl} \times N_{HCl} \times P_m N_2 / \text{mg muestra} \times 100$$

donde: V_{HCl} = volumen de mL de HCl gastados para neutralizar la muestra – volumen de mL de HCl empleados para neutralizar el blanco y N_{HCl} = normalidad de la disolución de HCl; $P_m N_2$ = peso molecular del nitrógeno ($14,007 \text{ g mol}^{-1}$).

El cálculo de la cantidad de proteína a partir del nitrógeno total se obtuvo aplicando el factor de conversión 6,25, utilizado para la carne y derivados, asumiendo que las proteínas de los productos cárnicos tienen un 16% de nitrógeno:

$$\% \text{ proteína} = \% N_2 \text{ total} \times 6,25$$

Todas las determinaciones fisicoquímicas se realizaron por triplicado.

III.5. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE TEXTURA

III.5.1. ANÁLISIS DEL PERFIL DE TEXTURA

El análisis de perfil de textura (*Texture Profile Analysis*, TPA) se realizó con un texturómetro *TA.XT2i Stable Micro System Texture Analyzer* (Stable Microsystems Ltd., Surrey, Inglaterra) suministrado por Aname S.L. y controlado desde un ordenador Pentium II mediante el programa *Texture Exponent 32*, versión 5.0.6.0. En los ensayos se utilizó una célula de carga de 5 kg. La calibración se realizó con una pesa de 2 kg. Para llevar a cabo el TPA se procedió de acuerdo a trabajos previos (Herrero *et al.*, 2007, 2009). Todos los ensayos se ejecutaron a temperatura ambiente, 22 ± 2 °C.

Se prepararon muestras con forma cilíndrica, con una altura de 1 cm y un diámetro de 25 mm, obtenidas mediante un sacabocados. El ensayo consistió en una prueba de doble compresión y para ello se empleó una sonda de presión con base plana de forma cilíndrica de aluminio de 25 mm de diámetro, modelo P/25, asociada a una plataforma de aluminio, modelo HDP/90, donde fueron colocadas las muestras para el análisis. El ensayo se efectuó a una velocidad de 2 mm s^{-1} . El tiempo de recuperación, transcurrido entre ambas compresiones, fue de 5 segundos, ascendiendo la sonda a su posición inicial a una velocidad de 10 mm s^{-1} . Se realizaron diez réplicas de cada muestra.

Una vez concluido el ensayo, se obtuvieron las gráficas o curvas de deformación fuerza-tiempo (Figura III.6). En ellas se representa la fuerza aplicada (ordenadas) frente al tiempo de ensayo (abscisas). Es posible obtener los siguientes parámetros a partir de las curvas:

- *Dureza*: definida como la altura máxima obtenida en el primer ciclo de compresión. Representa la fuerza máxima para producir una cierta deformación. Se expresa en unidades de fuerza (N).
- *Adhesividad*: corresponde al área de fuerza bajo el eje de abscisas que resulta tras la primera compresión. Se define como el trabajo necesario para retirar la sonda de la muestra después de realizar la primera compresión.

Presenta siempre un valor negativo. Se expresa en unidades de fuerza \times tiempo (N s).

- *Elasticidad*: se define como la capacidad de la muestra para recuperar su forma original, una vez que cesa (deja de aplicarse) la fuerza deformante. Corresponde a la diferencia entre las alturas registradas en la muestra tras la primera compresión (Distancia1) y al iniciar la segunda (Distancia 2). Se expresa en unidades de longitud (m).
- *Cohesividad*: se define como el grado en que una muestra puede deformarse sin llegar a romperse. Corresponde a la relación que existe entre las áreas positivas de la segunda y la primera compresión ($\text{Área2}/\text{Área1}$). Es adimensional.

A partir de ellos fue posible calcular estos parámetros secundarios:

- *Gomosidad*: fuerza para desintegrar una muestra semisólida para tragar (dureza \times cohesión). Se expresa en N.
- *Masticabilidad*: se define como el producto de la gomosidad y la elasticidad, es decir, el producto de dureza \times cohesividad \times elasticidad. Representa el trabajo necesario para desintegrar una muestra hasta dejarla lista para la deglución. Se expresa en unidades de fuerza \times longitud (N m).

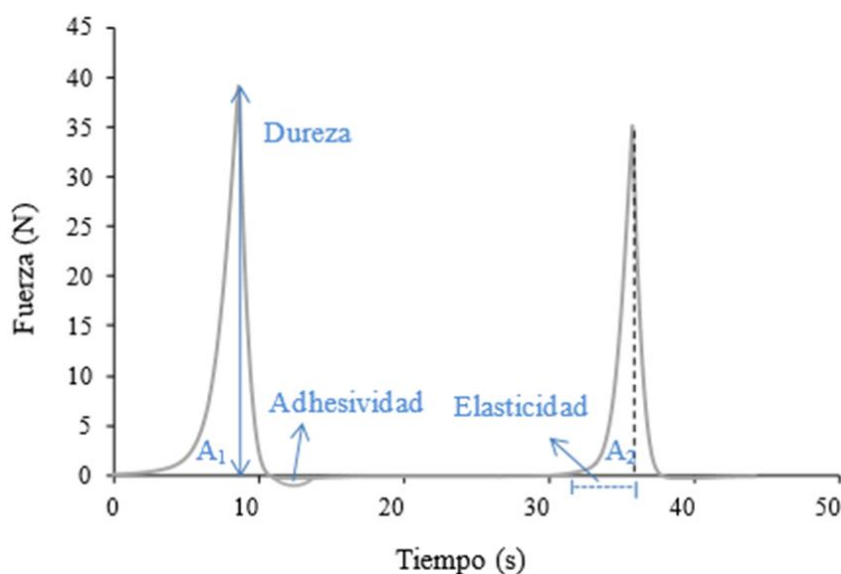


Figura III.6. Representación gráfica (fuerza-tiempo) de un análisis de perfil de textura (TPA). A: área; D: distancia.

III.5.2. ENSAYO DE TRACCIÓN UNIAXIAL DESTRUCTIVO

Para la realización de este ensayo, se emplearon unas pinzas A/MTG (Figura II.7) fijadas, por una parte, a la base del texturómetro y, por otra, al brazo móvil del equipo, conectado con la célula de carga. Se ensayaron probetas con una longitud de 7 cm y una anchura entre 0,2 y 0,5 cm. Éstas se colocaron entre los dos extremos de las pinzas, de forma que quedasen lo más estiradas posibles, y se inició la tracción a una velocidad de 1 mm s^{-1} hasta la rotura. Se empleó una célula de carga de 5 Kg y las medidas se realizaron a temperatura ambiente. Se realizaron unos 10 ensayos por tipo de muestra.



Figura III.7. Pinzas A/MTG.

Una vez concluido el ensayo, se obtuvieron las curvas fuerza-distancia o fuerza tiempo (Figura III.8). La fuerza máxima (N) obtenida en dichas curvas fue considerada como la fuerza de ruptura. La resistencia a la ruptura (N cm^{-2}) fue calculada como el cociente entre la fuerza máxima y el área de sección (anchura x espesor). Para calcular este parámetro sólo se consideraron válidos los ensayos en los que la ruptura se produjo en la parte central de las probetas.

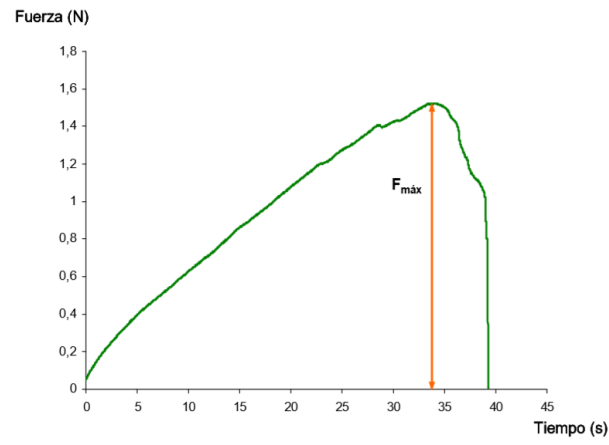


Figura III.8. Representación gráfica fuerza-tiempo de un ensayo de tracción uniaxial destructivo.

III.6. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La determinación de la microestructura de las muestras mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) requirió una preparación previa de las mismas, la cual implicó corte, deshidratación, evaporación y metalización de las mismas. El corte de las muestras se realizó en forma de cubos con un tamaño de 5x5x5 mm.

Posteriormente, fueron sumergidas en una solución de glutaraldehído al 2,5 % en suero fisiológico (concentración salina al 0,9 %) durante 4 horas para su fijación. Durante este período las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4 °C. Seguidamente las muestras se lavaron con solución salina 3 veces para retirar los restos de fijador. Para la deshidratación de las muestras, una vez fijadas, el agente empleado fue el etanol. Se prepararon diferentes soluciones con concentraciones crecientes de etanol, desde el 30 % hasta el 100 % (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 y 100). Las muestras se introdujeron dos veces en la misma concentración, haciendo un trasvase a otro recipiente con solución nueva cada 30 minutos. De esta forma, la muestra permaneció una hora en cada concentración de etanol.

A continuación, se realizó el secado de las muestras mediante punto crítico (CPD, *critical point drying*) que consiste en desplazar el etanol de las muestras con CO₂ líquido en condiciones estándar (temperatura = 31°C, presión = 7,38 x 10⁶ Pa), para posteriormente cambiar el CO₂ líquido a CO₂ en estado gaseoso y finalizar el proceso de secado liberando presión hasta alcanzar la presión atmosférica. El secado de punto crítico es un método para secar tejidos sin que estos colapsen o deformen su estructura original, minimizando las tensiones superficiales del tejido. Se utiliza con frecuencia en MEB cuando se pretende visualizar muestras biológicas. Para llevar a cabo la deshidratación de las muestras se utilizó un secadero por punto crítico Balzers CDP-030.

El siguiente paso fue la evaporación (a vacío), que consiste en recubrir las muestras con grafito. Para este procedimiento, se utilizó un evaporador Balzers SCD-004 Sputter Coater y el recubrimiento con grafito se realizó en un equipo Mini deposition System MED 010 Balzers.

Por último, se procedió a la metalización de las muestras con oro (Emitech K550x Sputter Coater, 25 mA, 4 minutos), para su correcta visualización en el microscopio electrónico de barrido (JEOL mod. JSM 6400, Japón). Las muestras utilizadas no son buenas conductoras, por lo que es necesario hacer conductora la superficie, eliminar la electricidad estática, minimizar el daño por radiación y aumentar la reflectividad electrónica.

El proceso completo, desde el secado de las muestras mediante el punto crítico hasta la visualización en el microscopio electrónico de barrido, fue realizado en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (ICTS) de la UCM.

III.7. ENSAYO CON FLUORESCAMINA

El grado de proteólisis se estimó mediante la medida de grupos amino-terminales libres usando un ensayo con fluorescamina (Jansson et al., 2014). Para ello, se solubilizaron 100 mg de muestra en 1 mL de solución salina [tampón fosfato (0,05 M), NaCl (0,14 M), pH 6,7]. A 500 μ L de una solución de ácido tricloroacético (1,67 M) en agua se añadió un volumen igual de muestra solubilizada, y la mezcla se mantuvo en hielo durante 20 minutos para permitir la precipitación de proteínas. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada (17000g ,20 minuto) y luego filtrada. Una alícuota de 12,5 μ L de este filtrado se mezcló con 1 mL (100 mM) de buffer borato y 500 μ L (719 μ M) fluorescamina en acetona. 250 μ L de esta disolución fueron transferidos a cada pocillo de una microplaca de microtítulo. Se midió la fluorescencia de las muestras 18 minutos después de la adición de la fluorescamine, a una longitud de onda de 390 nm.

III.8. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

La fracción de proteínas miofibrilares se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate-poly- acrylamide gel*). Para ello, las proteínas miofibrilares se extrajeron por homogeneización de 1 g de muestra en 5 mL de una solución constituida por urea (7 M), tiourea (2 M) y Tris base (400 mM). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 g durante 20 min a 4° C, y se separó el sobrenadante con las proteínas miofibrilares. La concentración de proteína de los extractos se determinó mediante el método de Bradford. La concentración de proteína se ajustó con agua para obtener una concentración final de 2 mg/mL y se diluyó (1:1) con tampón SDS-PAGE [SDS 2%, 20% de glicerol, 20 mM Tris-Cl, pH 6,8, ácido etilendiaminotetracético (EDTA, 2 mM), 160 mM Ditioneitol (DTT) y 0.1 mg/mL azul bromofenol] para obtener una concentración final de 1 mg/mL. Las muestras fueron calentadas a 100° C durante 5 minutos antes de la electroforesis. Se realizó SDS-PAGE bajo condiciones reductoras en geles prefabricados. La cantidad de solución de proteína inyectada en los geles de electroforesis fue de 20 µL en cada carril. Después de la electroforesis, los geles fueron cubiertos con solución fijadora (40% de metanol y ácido acético al 10%) y luego se tiñeron usando azul brillante de Coomassie. Los pesos moleculares de los productos de la proteólisis se estimaron por referencia a la movilidad relativa de proteínas estándar.

III.9. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

III.9.1. IMAGEN DE RESONANCIA MAGNÉTICA (IRM) Y RELAXOMETRÍA T₂ DE ALTO CAMPO

Los experimentos de imagen y relaxometría T₂ de alto campo se realizaron en un espectrómetro *Bruker BIOSPEC 47/40* (BrukerGmbH, Ettlingen, Alemania) horizontal que opera a 4,7 Teslas (200 MHz), equipado con un sistema de gradientes apantallado de 6 cm de diámetro que permite un gradiente de 450 mT m⁻¹ (Figura III.9).



Figura III.9. Espectrómetro Bruker BIOSPEC 47/40 utilizado en el análisis de IRM y de relaxometría T₂ de alto campo.

Para ambos tipos de experimentos, las muestras fueron cortadas en pequeñas piezas (3 cm largo, 2 cm ancho, 1,5 cm espesor) y se colocaron sobre una sonda de volumen de 3,5 cm de diámetro. De esta forma, la muestra se situó en la bobina de radiofrecuencia que se emplea para la transmisión y recepción de la señal.

En los experimentos de IRM, para las medidas del tiempo de relajación espín-espín o transversal (T₂), se obtuvieron 60 imágenes a diferentes tiempos de eco (TE = 5-300 ms). El resto de parámetros permanecieron constantes (NA = 1; TR = 3046,1 ms; MTX = 256 x 128, FOV = 5 x 2,5 cm; grosor del corte= 1 mm; número de corte = 1).

Los datos así obtenidos se ajustaron a una exponencial de acuerdo con la ecuación:

$$S(TE) = S_0 \exp(-TE/T_2)$$

donde S(TE) es la señal de la imagen a cada tiempo de eco (TE) y S₀ es la señal cuando TE es igual a cero.

Para las medidas del tiempo de relajación espín-red o longitudinal (T₁) se adquirieron experimentos utilizando diferentes valores en el tiempo de repetición (TR = 52,5-6002,5 ms) hasta obtener un total de 13 imágenes. El resto de parámetros de

adquisición que permanecieron constantes entre los diferentes experimentos fueron: NA = 1; TE = 5 ms; MTX = 256 x 128; FOV = 5 x 2,5 cm; grosor del corte = 1 mm; número de cortes = 1.

Los datos así obtenidos se ajustaron a una exponencial de acuerdo con la ecuación:

$$S(TR) = S_0 [1 - \exp(-TR/T_1)]$$

donde S(TR) es la señal de la imagen a cada tiempo de recuperación (TR) y S_0 es la señal cuando el TR es igual a infinito.

Para las medidas del Coeficiente de Difusión Aparente (CDA) las imágenes se adquirieron con seis valores de ponderación de la difusión (valor $b = 48,4-54969,9 \text{ s mm}^{-2}$). El resto de parámetros de adquisición que permanecieron constantes entre los diferentes experimentos fueron: (NA = 1; TR = 2000 ms; TE = 45 ms; $\Delta = 25\text{ms}$; $\delta = 10 \text{ ms}$; MTX = 256 x 128; FOV = 5 x 2,5 cm; grosor del corte = 1 mm; número de cortes = 1).

Los datos así obtenidos se ajustaron a una exponencial de acuerdo con la ecuación:

$$S(b) = S_0 \exp(-CDA * b)$$

donde S(b) es la señal potenciada en difusión y S_0 es la señal de la imagen cuando el valor de la potenciación en difusión (b) es igual a cero.

Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el programa Image J.

En los experimentos de relaxometría, los tiempos de relajación T_2 fueron obtenidos sin emplear gradientes, es decir, a partir de la muestra completa, utilizando la secuencia Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). Se obtuvieron un total de 256 ecos con un tiempo de eco (TE) de 2 ms. Sin embargo, solamente los ecos pares fueron registrados y empleados para el cálculo de las distribuciones T_2 , por tanto, el auténtico tiempo de eco fue de 4 ms. Las distribuciones fueron obtenidas utilizando el programa UpenWin 1.01 (Università di Bologna, Bologna, Italia).

Los experimentos de IRM y relaxometría T_2 de alto campo se realizaron en la Unidad de RMN del CAI de Bioimagen Complutense (sede del Instituto Pluridisciplinar).

III.9.2. RELAXOMETRÍA DE BAJO CAMPO (LOW-FIELD NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE, LF-NMR)

Los experimentos espín-eco de relaxometría de RMN bajo campo se realizaron en un equipo *Maran Benchtop Pulsed NMR Analyzer* (Resonance Instruments, Witney, UK), con una frecuencia de resonancia de 23,2 MHz y equipado con una sonda de temperatura variable de 18 mm (Figura III.10).



Figura III.10. *Maran Benchtop Pulsed NMR Analyzer.*

El tiempo de relajación transversal, T_2 , se midió utilizando la secuencia de pulsos de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (Carr & Purcell, 1954; Meiboom & Gill, 1958):

$$[90^\circ - (\tau - 180^\circ - \tau) n - \text{adquisiciones}]$$

con un valor τ (tiempo entre el pulso de 90° y el pulso de 180°) de 150 μs . Los datos adquiridos resultaron de la suma de 16 scans. El tiempo de repetición entre dos adquisiciones sucesivas fue 2 s. Las muestras cárnicas (4 cm de longitud, 1 cm de diámetro y aproximadamente 5 g de peso) se depositaron en un tubo cilíndrico de vidrio (5 cm de longitud, 14 mm de diámetro) que se introdujo directamente en el equipo. Antes del ensayo, las muestras se atemperaron a 25 $^\circ\text{C}$ en un baño de agua durante unos 15-20 minutos. Los datos de T_2 obtenidos se analizaron con el programa MatLab, versión 6,5, utilizando scripts internos, según el algoritmo de regularización propuesto por Butler et al., (1981). Las distribuciones de ajuste exponencial se muestran en una gráfica que refleja la intensidad de la relajación vs tiempo de relajación. Se realizaron seis medidas de cada producto y tiempo de maduración.

Los experimentos de relaxometría T_2 de bajo campo se realizaron en el Food Science Department (Food, Metabolomics and Sensory Group), Aarhus University, Dinamarca.

III.9.3. ESPECTROSCOPÍA DE RMN DE ALTA RESOLUCIÓN.

Se utilizaron dos equipos distintos para llevar a cabo los experimentos de RMN de alta resolución, ^1H RMN HRMAS (*high resolution magic angle spinning*).

Los experimentos realizados en la Unidad de RMN del CAI de Bioimagen Complutense (sede del Instituto Pluridisciplinar) se llevaron a cabo en un espectrómetro *Bruker AMX500* (BrukerGmbH, Ettlingen, Alemania) que opera a 11,7 Teslas (frecuencia de resonancia 500,13 MHz) equipado con una sonda de HRMAS (Figura III.11). Se utilizaron aproximadamente 8 - 10 mg de muestra a los que se les agregó una solución de 20 μl D_2O con sal de sodio del ácido 3-Trimetilsilil Propionico (TSP, 0,1 mM). Las muestras se colocaron dentro de un rotor cilíndrico de óxido de zirconio de 50 μl . La velocidad de giro fue de 4 MHz y los ensayos se realizaron a una temperatura de 4 $^{\circ}\text{C}$. La secuencia de pulsos empleada fue 1D NOESY con presaturación de la señal del agua con un tiempo para la relajación / presaturación de 2 s, un tiempo de mezcla de 150 ms y un t_1 fijo de 3 μs . Los espectros fueron adquiridos a 16k puntos de datos, como suma de 256 adquisiciones con un tiempo total del experimento de 14 min y una anchura espectral de 8333 Hz.

Todos los espectros fueron procesados utilizando el software Topspin, versión 2.1. A continuación, se ajustó la fase y la línea base de los espectros y se referenciaron al TSP $\delta = 0$ ppm.



Figura III.11. Espectrómetro Bruker AMX 500 MHz equipado con una sonda HRMAS (*high resolution magic angle spinning*) para el análisis de muestras semi-sólidas.

Los experimentos de ^1H RMN HRMAS realizados en el *Food Science Department*, Dinamarca, se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker Advance 600 MHz (BrukerGmbH, Ettlingen, Alemania) que opera a una frecuencia de resonancia de

600,13 MHz, equipado con una sonda de HRMAS (Figura III.12). Una solución de D₂O (15 µL) junto con TSP (0,1 mM) se añadió a una cápsula HRMAS desechable Kel-F con capacidad de 30 µL (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) junto con la muestra cárnica (10 ± 2 mg). La cápsula se introdujo en un rotor de zirconio de 4 mm. Los espectros ¹H RMN fueron adquiridos a 4 °C y una velocidad de giro de 5 MHz. Para ello, se utilizó la secuencia espín-eco Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) con un tiempo de eco de 300 ms con el fin de eliminar las señales más intensas correspondientes a lípidos y macromoléculas. Los espectros fueron adquiridos a 32k puntos de datos, con un tiempo de repetición de 5 s. Se corrigió su fase, su línea base y finalmente se referenciaron a TSP utilizando el software Topspin, versión 2.1.

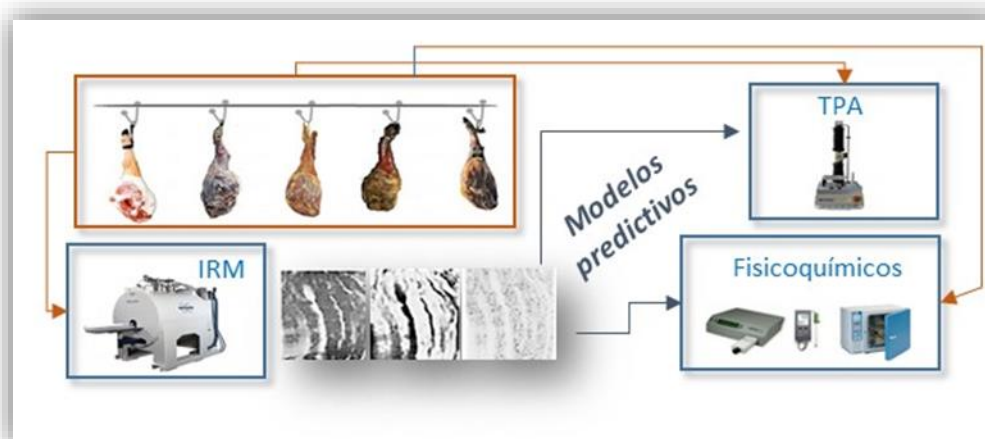


Figura III.12. Espectrómetro Bruker Avance 600 MHz equipado con una sonda HRMAS (high resolution magic angle spinning) para el análisis de muestras semi-sólidas.

IV. Resultados

IV.1. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA (MACRO Y MICRO) DE DISTINTOS PRODUCTOS CÁRNICOS CURADOS

La primera parte de esta Tesis Doctoral compila los trabajos del 1 al 4, en los que se describen los resultados obtenidos tras la consecución del primer objetivo.



Trabajo 1

Empleo de la IRM como herramienta predictiva para la estimación de parámetros fisicoquímicos y reológicos durante el proceso de elaboración de jamón curado

Enviado a *Meat Science*

Durante los últimos años, se ha puesto de manifiesto la importancia de desarrollar nuevos métodos rápidos de análisis con el fin de controlar el proceso de elaboración de productos cárnicos de forma segura y eficiente. El desarrollo de nuevas metodologías contribuye a obtener resultados con mayor rapidez, suponiendo ahorro de tiempo y material. En este contexto, la RMN es una de las técnicas analíticas que mayor auge ha experimentado en el ámbito alimentario, dadas sus numerosas ventajas frente a otras metodologías.

Dado el potencial de la IRM para estudiar el interior de los alimentos de forma no destructiva y no invasiva, en el **Trabajo 1** se describe el uso de la IRM como herramienta predictiva para el cálculo de características reológicas y parámetros de textura durante la maduración de jamón curado. La IRM permitió la monitorización del proceso de elaboración del producto, revelando las principales modificaciones macroestructurales que tienen lugar en la matriz miofibrilar proteica durante la maduración. Para ello, se analizaron perniles con distinto grado de curado (fresco, salado, post-salado, secado y bodega) y músculos con distinta localización anatómica en cada caso (bíceps femoral, semimembranoso y semitendinoso) para observar posibles diferencias en el proceso de maduración dado su grado de exposición al aire. Se obtuvieron los parámetros de IRM (T_1 , T_2 y CDA) para cada etapa y músculo y se observó una progresiva disminución de los mismos con el tiempo de curado, asociada a las cinéticas de deshidratación y difusión de sal. A partir de los parámetros de IRM fue posible establecer modelos matemáticos aptos para calcular contenido en agua y sal, así como características de textura, determinadas normalmente mediante métodos destructivos, de manera que a partir de un solo análisis sería posible obtener gran cantidad de información en un tiempo muy corto. El uso de esta metodología para el control de calidad en las líneas industriales supondría un gran avance, reduciendo los tiempos de análisis, así como las pérdidas de producto.

Use of MRI as a Predictive Tool for Physicochemical and Rheological Features During Cured Ham Manufacturing

A.B. García-García^a, M.E. Fernández-Valle^b, D. Castejón^b, R. Escudero^a, M.I. Cambero^{a*}

^a) Sección Departamental de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Spain.

^b) Centro de Asistencia a la Investigación de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico. Universidad Complutense de Madrid. 28040. Madrid. Spain.

*Corresponding author. Tel: +34 913943745; Fax: +34 913943743; E-mail: icambero@vet.ucm.es

Abstract: Magnetic resonance imaging (MRI) was used to study the structural changes during dry-cured ham manufacturing. T_1 , T_2 and apparent diffusion coefficient (ADC) were determined. Dry cured hams were analysed at different steps of the manufacturing process (raw, salted, post salted, half-cured and cured). Structural changes have been linked with the rheological behaviour, estimated by texture profile analysis (TPA) performed in three different muscles of hams (*semimembranosus*, *semitendinosus* and *biceps femoris*). A decrease for T_1 , T_2 and ADC parameters was observed, connected to the dehydration kinetics and salt diffusion. Curing process increased hardness and chewiness and reduced elasticity and cohesiveness. Mathematical models were defined to obtain useful equations to monitor ripening. Multiple and simple linear regression models were performed to predict water and salt content and rheological features evolution through MRI parameters. Best settings were achieved with water and salt content for the three studied muscles (R^2 around 0.90). T_1 , T_2 and ADC showed a negative correlation with hardness and a positive relation with springiness and cohesiveness.

Keywords: cured ham, magnetic resonance imaging (MRI), texture profile analysis (TPA), predictive models.

1.Introduction

Dry-curing has evolved from a mere meat preservation process to an improved procedure, in order to obtain a flavourful and attractive meat product with particular and characteristic sensory traits (Toldrá & Flores, 1998). Cured ham, in particular, is one of the most valuable meat products, both inside and outside Spain, with a first-rate consumer acceptance. It is a non-homogeneous product that undergoes a salting stage and then is subjected to a long dehydration/ripening process (taking between 12 to 24 months) during which the dynamics of the migration of the water and salts is balanced (Arnau et al., 1995) and flavour is developed. Given the technological and economic importance of this product, the development of suitable analytical tools is essential to know the quality of ham at its best.

A non-invasive and non-destructive way of measuring moisture profiles is through the application of nuclear magnetic resonance (NMR) techniques. Proton NMR is performed by applying a radio frequency pulse to a sample within a magnetic field and assessing the relaxation properties of the hydrogen nuclei of the sample (Charlton, 2009). Magnetic resonance imaging (MRI) permits the quantification of water content and distribution, and its interaction with the food matrix by magnetic resonance parameters such as transverse relaxation time (T_2), longitudinal relaxation time (T_1) and the apparent diffusion coefficient (ADC). (Fantazzini et al., 2009; Marcone et al., 2013). These magnetic resonance parameters are potentially sensitive to variations of water mobility and environment (T_1 and T_2) and facility of diffusion of the water in all directions (ADC) resulting from the modification of water macromolecule interactions and changes in tissue structure (Boulby & Rugg-Gunn, 2003; Gowland & Stevenson, 2003; Wheeler- Kingshott et al., 2003). Due to the extensive information gained through this technique, it has been used in meat science to study carcass composition, adipose tissue distribution, connective tissue and muscle fibre type. These parameters have also been correlated with meat properties, including pH, water-holding capacity, moisture, texture and sensory attributes. (Tingle et al. 1995; Bonny et al., 2000, Cernadas et al., 2005, Laurent, Bonny & Renou, 2000, Guiheneuf et al. 1997; Guiheneuf et al 1996; Herrero et al., 2007, Herrero et al. 2009; Mitchell et al., 2001, Renou, Foucat & Bonny 2003, Ruiz-Cabrera et al., 2004 and Shaarani, Nott & Hall, 2006). However, few studies have been performed on dry-cured ham (Manzocco, L., 2013; Fantazzini et al., 2009) and even this technique has not been used so far to carry out a detailed study of the changes that take place during Spanish dry cured ham manufacturing.

Moreover, texture is one of the key quality attributes used in the food industry to assess product quality and acceptability. Meat products obtained by processing operations, such as curing, show a non-isotropic behaviour, influenced by the internal structure, including different tissues and different chemical composition. The evaluation of the rheological behaviour contributes to understand the effect of processing on products, probes the system structure and reveals critical aspects of food texture (Foegeding, 2003). Nowadays, the most commonly used instrumental method is probably, the texture profile analysis (TPA) test, which is based on the imitation of chewing process and is performed with double-compression cycles. TPA has been

employed for many authors as a usual way to evaluate sensorial properties of cured ham (Tabilo et al., 1999; Morales et al., 2007a, 2007b; Aliño et al., 2010; Benedini et al., 2012).

The aim of this study was to apply MRI technique to pork in different stages of the curing process to determine relaxation times T_1 and T_2 , and ADC , relating these results to those obtained from compression textural analysis (TPA) and physicochemical characteristics in order to obtain useful equations to monitor the ripening process. Linear regression statistics could be used to predict physicochemical and rheological behaviour using the imaging parameters as predictor variables.

This study constitutes the first attempt to relate MRI parameters, which provide structural information, with textural attributes of meat products. The establishment of suitable mathematical models would allow using MRI to estimate the rheological behaviour of meat products without realizing complex instrumental analyses, such as the TPA, which requires a laborious procedure. Finally, this work is focused on increasing the existing knowledge on the potential application of the MRI for the estimation of food quality and process control.

2. Materials and methods

2.1. Meat sampling

A total of 35 fresh hams (10-11 kg) obtained from white-breed pigs, (*Landrace x Large White* female animals slaughtered at 100-120 kg live weight), were purchased from a local manufacturing plant. The legs were randomly chosen. The process of salting and ripening was the one usually followed by a standard production plant of Spanish dry-cured hams (Santos et al., 2008). Sampling was carried out at the most relevant stages of the process (Figure 1):

- Raw hams (R). The pieces were taken at 3 days after slaughter.
- Salted hams (S). Raw hams were covered with a mixture of salts (NaCl amount equivalent to 2% of the weight of the ham, 200 ppm of KNO_3 and 100 ppm of $NaNO_2$). Samples were taken one hour, approximately, after salt addition.
- Post-salted hams (PS). Hams covered with salts were staked for a period of 0.75 day per kg of fresh ham. The samples were taken after removing salt left on the surface of the hams.
- Hams in drying period for 6 months (Half-cured hams, 6M). Post-salted hams were washed with cold water and hung for 30 days at 4 ± 1 °C. Then the pieces were maintained at 13–15 °C and RH 75–85% for three months, and at 22–26 °C, RH 60–75% for two months.
- Hams analysed at 8 months corresponding to the end of the drying process (Half-cured hams, 8M). Pieces processed as previously mentioned but taken after three months at 13–15 °C and RH 75–85%, and four months at 22–26 °C, RH 60–75%.

- Hams at ripening process with a total ageing of 12 months (Ageing, 12 M). After a drying process of 8 months, the cured hams were left for four months at 12-17 °C and RH 60-80%

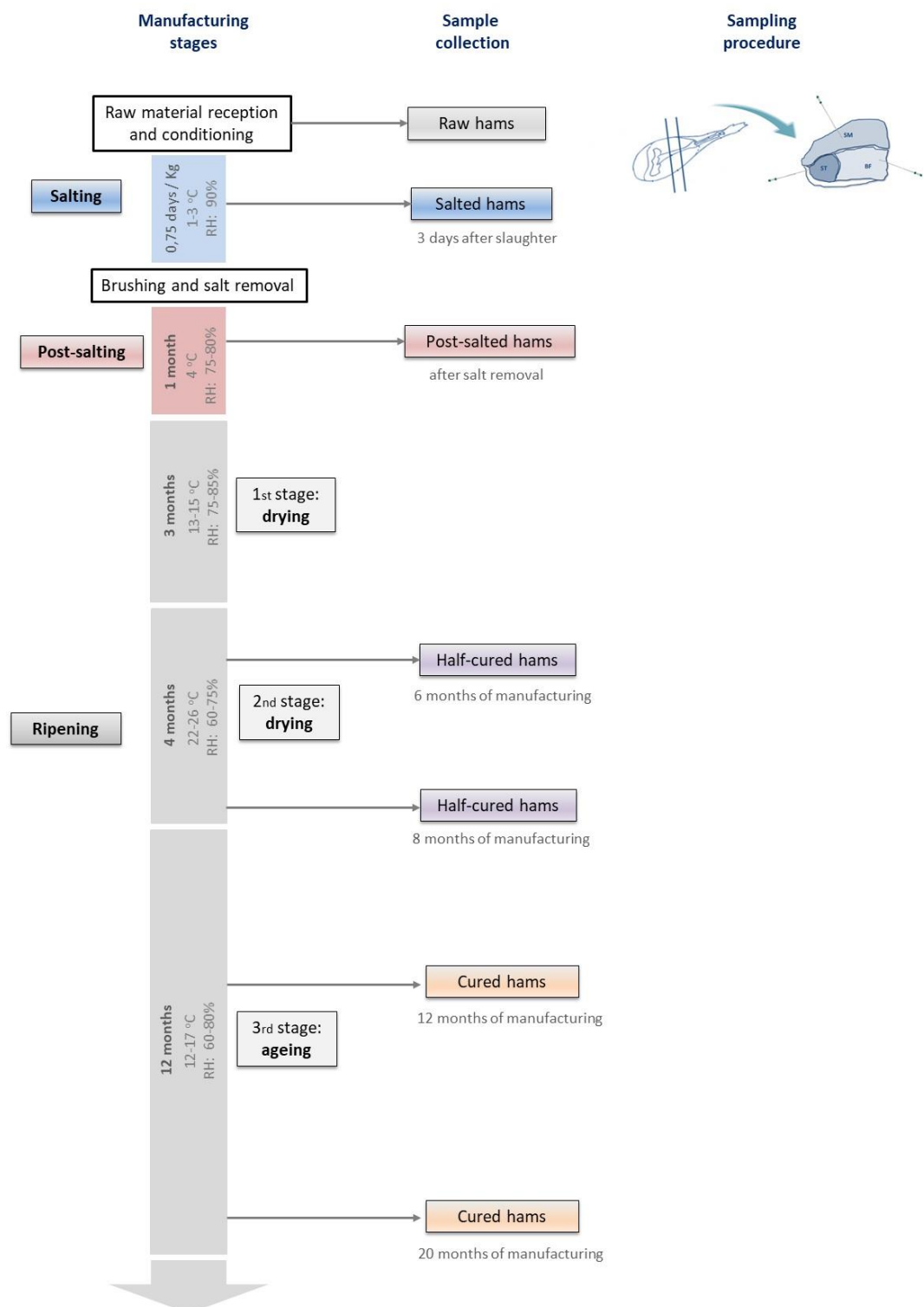


Figure 1. Sample collection and sampling procedure, showing the Anatomical localization of muscles under analysis (Biceps femoris [BF], Semimembranosus [SM] and Semitendinosus [ST]) in the pork leg.

- Hams ripened up to 20 months (Ageing, 20 M): dry-cured hams with a total ripening period of 20 months.

5 pieces were analyzed at each stage. All the hams used corresponded to the right side of the animal. Once the bones, skin and fat had been removed, muscles corresponding to different anatomical locations [*biceps femoris* (BF) and semitendinosus (ST), internal-type muscles, and *semimembranosus* (SM), an external-type one] were taken from the leg, as displayed in Figure 1. The visible fat and connective tissue were totally removed from the separated muscles pieces.

2.2. Physicochemical analyses

Water activity (a_w), pH, dry matter (DM), salt content and fat content were determined in triplicate samples of each of the considered muscles. a_w was measured using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) at 25 °C. The pH was determined in a homogenate of the sample with distilled water (1:10) (w/v), using a Crison Digit-501 pH meter (Crison Instruments LTD, Barcelona, Spain). DM was determined by drying the sample at 110 °C to constant weight and the results were expressed as a percentage (AOAC, 2006). The salt content was measured by AOAC method 935.47 (AOAC, 1995). Fat content was determined using the method of Bligh and Dyer, described by Hanson and Olley (1963).

2.3. Magnetic Resonance Imaging (MRI)

MRI experiments were performed using a Bruker BIOSPEC 47/40 spectrometer (Bruker GmbH, Ettlingen, Germany) operating at 4.7 T (200 MHz). Magnetic field gradients for imaging in the three orthogonal directions were generated by a 6 cm actively shielded gradient set capable of reaching 450 mTm⁻¹. Each of the samples for imaging, coming from the inner part of each of the three muscles studied (BF, ST, SM), was cut approximately 4 cm long, 2 cm wide and 1.5 cm thick. Individual specimens were placed in a radio frequency birdcage coil with an inner diameter of 3.5 cm. The temperature inside the magnet was maintained at 18 °C using a water circulator. For the MRI experiments a first global shimming was performed and then three scout spin-echo experiments in axial, sagittal and coronal directions were acquired.

For measurements of T_2 , 60 separate images were acquired at different echo times ($TE = 5$ -300 ms). All other imaging parameters remained constant between images (NA = 1; TR = 3046.1 ms; MTX = 256 x 128, FOV = 5 x 2.5 cm; slice thickness = 1 mm; slice number = 1).

T_1 relaxation time measurements were conducted on the same slice using a spin-echo sequence. 13 separate images were acquired at different recovery times. TR varied from 52.5 to 6002.5 ms. All other imaging parameters remained constant between images (NA = 1; TE = 5 ms; MTX = 256 x 128; FOV = 5 x 2.5 cm; slice thickness = 1 mm; slice number = 1).

To measure the apparent diffusion coefficient (ADC), separate images were acquired at six diffusion weightings (b value varied from 48.4 to 54969.881 s mm⁻²). All other imaging parameters

remained constant between images (NA = 1; TR = 2000 ms; TE = 45 ms; Δ = 25ms; δ = 10 ms; MTX = 256 x 128; FOV = 5 x 2.5 cm; slice thickness = 1 mm; slice number = 1).

From these sequences, T_1 , T_2 and ADC maps were calculated using Image J 1.44p (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). The mean values at ten different Region of Interest (ROIs) in each map were measured to obtain the T_1 , T_2 and ADC values.

2.4. Texture Profile Analysis (TPA)

Texture profile analysis (TPA) was performed using a TA.XT2i SMS Stable micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the Texture Exponent 32, 6.0.7.0. version. Eight sample cores (diameter = 2.5 cm, height = 1.0 cm) were obtained from the inner part of each of the studied muscles. A double compression cycle test was performed of up to 50% compression of the original height with an aluminium cylinder probe P/25. Force–time deformation curves were obtained with a 5 kg load cell applied at a cross-head speed of 1.0 mm/s. Hardness (N); springiness (cm); adhesiveness (N s); cohesiveness (dimensionless); gumminess (N), (hardness \times cohesiveness) and chewiness (J) (hardness \times cohesiveness \times springiness) were quantified according to Segura *et al.*, 2015. The compression force was performed in longitudinal direction to muscle fibres. Measurements of samples were carried out at room temperature.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion XVI for Windows (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). Data were presented as mean values and standard deviation (SD). Chemical and TPA analyses were carried out in triplicate. To check the normal distribution (90% confidence) of samples, the Shapiro–Wilks test was applied. When samples fitted the normal distribution, the one-way ANOVA analysis was performed. When samples did not fit the normal distribution, the Kruskal–Wallis test was used to test the null hypothesis that the medians of variable within each of the levels in the samples were the same. Both Duncan's test for multiple mean comparisons and the Pearson product moment correlation (R), using the Durbin–Watson statistic tests at 95%, of confidence level, were performed to determine the relationships between data from TPA, physicochemical analysis and MRI parameters.

The multiple linear regressions were performed to determine the relationships between data obtained by water and salt analysis, TPA and NMR parameters. To describe the relation between textural and MRI parameters, surface models were obtained by regressions analysis to estimate the response function as shown below:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

where Y is the predicted response (estimated textural parameters values), β_0 , β_i , β_{ii} , and β_{ij} , are the estimated coefficients from regression. They represent the linear, quadratic and cross-product relation among MRI parameters [T_1 (X_1), T_2 (X_2) and ADC (X_3)] and textural features on the response. ANOVA was applied to test the statistical significance of each factor introduced in the model and non-significant factors, with a confidence level of 95% ($p > 0.05$), were gradually eliminated. In order to check the goodness of fit of the calculated models, Root Mean Square Error (RMSE) was also obtained according to the following equation:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (X_{pred} - X_{obs})^2}{n}}$$

where, X_{pred} is the estimated data, X_{obs} is the result obtained in the experimental analyses and n the number of samples.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical analyses

The mean values and their corresponding deviation of the physicochemical characteristics obtained for each of the main stages of the curing process are shown in Table 1. a_w dropped after 12 months of ripening in the three considered muscles. This decrease in a_w is the main mechanism to ensure the microbiological product safety since pH underwent little variation during the process and remained at values ranging from 5.57 to 6.30. Dry matter (DM) content of the muscles selected increased significantly throughout the curing process ($p < 0.05$). Lower moisture content and a_w are related to salting due to the osmotic effect of salt added to the surface of ham and dehydration during resting and maturation. Significant differences ($p < 0.05$) were found among muscles. As expected, the moisture content decreased quicker in the external muscle (SM) not covered by skin and/or fat than in the inner ones (BF and ST) (Arnau, Casademont & Gou, 1995) so SM presented the highest DM values and the lower a_w during the hole process. Although ST is located in a deeper layer of the pieces, BF is surrounded by a thick layer of fat, which reduces its water loss (DM around 44.0 g/100 g product in BF and around 49.9 g/100 g product in ST at the end of processing time). An increase on NaCl content was observed during the studied stages, related to the penetration of the salt added to the raw pieces. At the end of the ripening time, the highest NaCl content ($p < 0.05$) was observed in BF muscle (5.7 ± 0.7) followed by SM and ST, with values of 5.1 ± 0.5 and 4.7 ± 0.2 , respectively. These results are in agreement with the findings obtained by several authors (Arnau, Casademont & Gou, 1995; Fantazzini et al., 2009). Raw ST presented the highest fat content (5.46 ± 0.2 g/100 g product), followed by BF and SM (2.40 ± 0.1 and 2.13 ± 0.1 g/100 g product, respectively). With the progressive loss of water occurred the ensuing increase in the percentage of fat from pieces. According to previous studies (Kim et al, 2008), at the end of the process, ST presented the higher value (13.94 ± 1.3 g/100 g product) followed by BF (12.91 ± 1.2 g/100g product) and SM (11.11 ± 1.2 g/100 g product). In

Table 1. Physicochemical properties and chemical composition of muscles in different stages of the curing process of ham

Muscle type	Sample	a_w	pH	DM (g DM/100 g product)	Salt content (g salt/100 g product)	Fat content (g fat/100 g product)
BF	Raw	0.960±0.013 a, α	5.77±0.15 d, β	26.62±1.32 f, α		2.40±0.16 c, β
	Salted	0.967±0.002 a, α	6.02±0.15 a, α	28.21±1.31 e, α		7.27±0.92 b, β
	Postsalted	0.959± 0.005 b, α	6.03± 0.01 a, α	31.04±0.80 d, γ	0.88±0.99 b, β	8.50±1.10 b, β
	Half-cured (6 months)	0.911±0.011 c, α	5.89±0.16 c, α	38.92±0.81 c, γ	4.32±0.91 a, α	11.19±1.34 a, α
	Half-cured (8 months)	0.911±0.007 c, α	6.00± 0.01 ab, α	40.52±1.23 b, γ	4.62±0.98 a, α	11.01±0.85 a, α
	Ageing (12 months)	0.893±0.003 d, α	5.98±0.05 b, α	41.52±0.73 b, γ	5.7±0.73 a, α	12.91±1.24 a, α
	Ageing (20 months)	0.890±0.004 d, α	5.94±0.03 b, α	44.04±0.75 a, γ	6.01±0.81 a, α	12.54±0.71 a, α
SM	Raw	0.959±0.013 a, α	5.65±0.08 d, γ	25.90±1.66 f, α		2.13±0.14 d, β
	Salted	0.957±0.005 a, β	6.08±0.10 a, α	29.72±1.91 e, α		5.44±0.44 c, c
	Postsalted	0.936± 0.014 b, β	6.18± 0.12 a, α	41.52±0.80 d, α	5.35±0.88 a, α	5.10±0.63 c, c
	Half-cured (6 months)	0.902±0.010 c, α	5.87±0.17 c, α	48.21±2.91 c, α	5.05±0.44 a, α	8.94±0.56 b, β
	Half-cured (8 months)	0.897± 0.003 c, β	5.95± 0.01 b, β	56.42±1.45 b, α	5.55±0.46 a, α	10.35±0.90 a, β
	Ageing (12 months)	0.876±0.003 d, β	5.98±0.05 ab, α	60.35±0.48 a, α	5.18±0.59 a, α	11.11±1.24 a, β
	Ageing (20 months)	0.868±0.013 d, γ	5.89±0.02 c, β	61.23±0.72 a, α	5.79±0.77 a, α	11.24±0.54 a, β
ST	Raw	0.962± 0.004 a, α	5.97± 0.22 ab, α	28.2±0.52 d, α		5.46±0.22 c, α
	Salted	0.960± 0.003 a, β	6.14± 0.10 a, α	28.4±0.99 d, α		11.78±0.83 ab, α
	Postsalted	0.955± 0.004 b, α	6.01± 0.01 b, α	39.5±1.12 c, β	0.69±0.18 c, γ	12.21±1.27 a, α
	Half-cured (6 months)	0.906± 0.009 c, α	5.91± 0.15 b, α	41.8±1.32 c, β	4.32±0.31 b, α	12.52±0.88 a, α
	Half-cured (8 months)	0.909± 0.004 c, α	5.93± 0.02 b, γ	44.1±0.88 b, β	4.81±0.71 b, α	12.71±1.14 a, α
	Ageing (12 months)	0.886± 0.008 d, α	5.96± 0.04 b, α	47.8±1.36 a, β	4.79±0.28 a, β	13.94±1.32 a, α
	Ageing (20 months)	0.881± 0.002 d, β	5.91± 0.01 c, α	49.9±1.84 a, β	5.01±0.88 a, β	13.27±0.62 a, α

a, b: values in the same column for a same muscle with different lyrics differ significantly ($P<0.05$) (differences in a same muscle throughout the process)

α , β : values in the same column for the same curing stage of different muscles with different lyrics differ significantly ($P<0.05$) (differences between muscles throughout the process)

general, the estimated parameters are within the range of values for different hams cured Spanish type (Arnau, Casdemont & Gou, 1995; Fernández et al, 2007; Santos et al, 2008).

3.1. Magnetic Resonance Imaging (MRI)

3.2.1. Longitudinal or spin-lattice relaxation time

Figure 2.A shows MRI T_1 maps of ham at different relevant ripening times. The intensity of the signal acquired is determined by the interactions between the protons and other nuclei in the environment. Free water presents high T_1 values because of its mobility; when water is bound to macromolecules there is a loss of mobility with easier energy release and a decrease in the T_1 values. (Gowland & Stevenson, 2003).

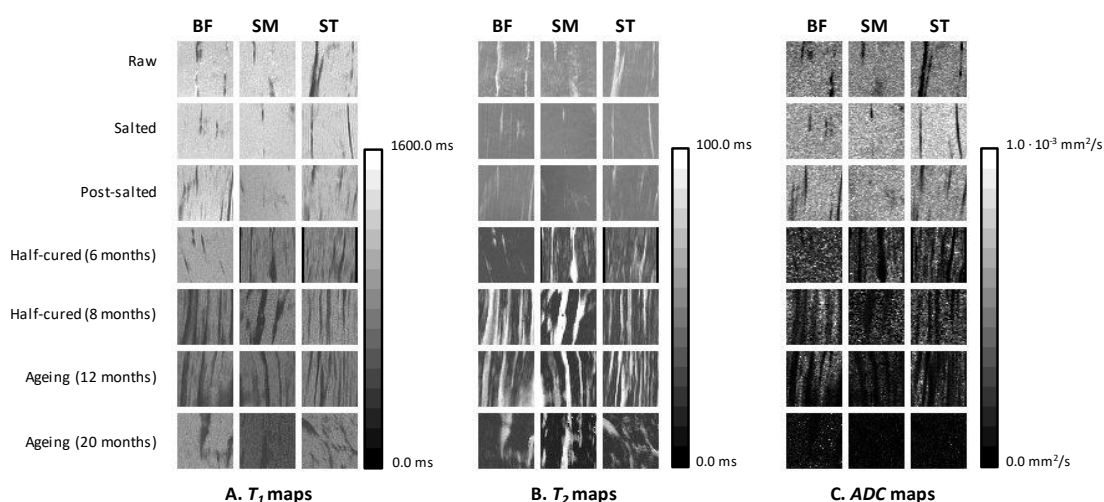


Figure 2. T_1 , T_2 and ADC maps obtained using MRI tool. **A:** T_1 maps, **B:** T_2 maps; **C:** ADC maps.

T_1 maps were characterised by areas with different intensity level. Fat appeared dark than lean tissue due to the ease in the relaxation of protons in the lipid molecules compared to those present in muscle.

Table 2 shows the median value of MRI parameters calculated for different Regions of Interest (ROIs) of BF, SM and ST. A progressive reduction of average T_1 was observed throughout ripening time in each of the concerned muscles. In BF, T_1 value decreased from 1409.0 ± 78.2 ms in raw product to 707.5 ± 13.4 ms in finished ham. The same trend was observed in the SM and ST muscles in which this parameter went from 1388.3 ± 73.9 to 483.6 ± 29.8 ms and from 1403.4 ± 47.5 to 698.0 ± 9.3 ms, respectively.

The observed T_1 reduction is due to the salt diffusion and water evaporation that takes place during the dry-curing progress. From the salting stage, sets a gradient of moisture from the inside to the surface of the meat pieces and from the surface to the environment. These facts, respond to the flow of water out by evaporation, osmotic dehydration and dissemination, all favoured by environmental conditions in which develops the process and salt addition (Arnau & Gou, 2001).

Table 2. IRM parameters from *Biceps femoris* (BF), *Semimembranosus* (SM) and *Semitendinosus* (ST) muscles in different stages of the process.

	BF			SM			ST		
	T_1 (ms)	T_2 (ms)	ADC (10^{-3} mm ² /s)	T_1 (ms)	T_2 (ms)	ADC (10^{-3} mm ² /s)	T_1 (ms)	T_2 (ms)	ADC (10^{-3} mm ² /s)
Raw	1286.2±58.2 a,β	45.6±1.7 a,α	0.26±0.02 b,α	1509.0±136.7 a,α	47.1±1.1 a,α	0.27±0.04 b,α	1465.8±100.5 a,α	46.9±1.2 a,α	0.15±0.01 d,β
Salted	1232.7±32.5 a,α	42.5±1.1 b,β	0.24±0.01 b,γ	1255.3±63.7 b,α	41.2±2.2 b,β	0.70±0.04 a,β	1189.0±70.0 b,α	46.2±1.0 a,α	0.89±0.11 a,α
Postsalted	1136.5±75.3 b,α	40.9±2.4 b,α	0.89±0.07 a,α	1026.5±34.2 c,α	35.7±2.6 c,β	0.77±0.07 a,β	1121.3±94.3 b,α	39.8±1.5 b,α	0.76±0.04 b,β
Half-cured (6 months)	965.3±33.5 c,α	28.3±6.0 c,α	0.08±0.03 c,β	778.8±30.6 d,γ	27.7±2.6 d,α	0.16±0.03 c,α	806.8±35.2 c,β	30.9±2.0 c,α	0.18±0.03 c,α
Half-cured (8 months)	737.7±27.9 d,α	26.9±2.2 c,α	0.06±0.01 c,α	694.1±48.0 e,α	19.7±3.2 e,β	0.02±0.00 e,β	800.7±47.4 c,α	26.1±1.7 d,α	0.05±0.00 e,α
Ageing (12 months)	707.6±29.9 d,α	24.7±3.6 c,α	0.08±0.03 c,β	592.7±20.2 f,β	19.2±2.2 e,β	0.06±0.03 d,β	693.0±33.5 d,α	24.8±1.9 d,α	0.20±0.03 c,α
Ageing (20 months)	704.7±19.0 d,α	15.4±1.1 d,α	0.04±0.01 d,α	478.5±28.7 g,β	9.7±1.2 f,β	0.01±0.00 e,α	695.9±26.5 d,α	12.8±0.9 e,α	0.02±0.00 f,α

a, b: values in the same column for a same muscle with different lyrics differ significantly ($P<0.05$) (differences in a same muscle throughout the process)

α, β: values in the same column for the same curing stage of different muscles with different lyrics differ significantly ($P<0.05$) (differences between muscles throughout the process)

T_1 values are also associated with muscle location within the ham. BF and ST are inner muscles of ham cushion; moisture decrease and salt uptake occur slowly, whereas SM is an outer muscle of the thigh, undergoing a direct exposure to air dehydration from salting to maturing. It is characterized by a marked moisture decrease that results in the lowest T_1 among assayed muscles at the same processing time. Moisture content in BF exceeds the values found in SM and also in ST during the whole process, so that T_1 gets the highest value for this muscle. Moreover, fat protons have lower relaxation time T_1 than muscle protons. This phenomenon is related to lower average T_1 of marbled muscles like ST.

3.2.2. Transverse or spin-spin relaxation time

MRI T_2 maps are shown in Figure 2.B. Transverse relaxation time (T_2) is mainly correlated with water mobility and is particularly sensitive to the porosity of the sample matrix. Longer T_2 times correspond to free water and to large pores or spaces in the sample matrix (Simpson et al., 2003). Therefore, any treatment or procedures, which reduce the porosity or free water, or increase the degree of water binding with the structures of the environment produces a drop in T_2 value (Boulby & Rugg-Gunn, 2003).

T_2 maps showed different areas: lean tissue gave a signal of low intensity due to its high structuration (mid-grey areas), while the signal caused by the fat was more intense (brighter zones). A high signal is related to greater coherence in relaxation, less influence among nuclei and, therefore, more tissue desestructuration.

Muscular average T_2 showed similar evolution to T_1 , decreasing gradually with the progress of the drying process (Table 2). T_2 values measured in raw ham experiments were: 46.1 ± 1.1 ms for BF, 46.7 ± 0.8 ms for SM and 46.9 ± 1.5 ms for ST. At the end of the process, relaxation times of 14.5 ± 0.5 ms, 9.0 ± 0.5 ms and 12.6 ± 0.7 ms, respectively, were obtained.

In addition to dehydration and muscle salt absorption, already mentioned, during curing process another phenomenon with a strong influence on T_2 takes place: the solubilisation of myofibrillar proteins results in a reduction of the gap between filaments and prevents the molecular mobility, which leads to increase the compaction of muscle and to reduce T_2 signal (Fantazzini et al. 2009; Manzocco et al. 2013).

Regarding the three muscles studied the decline in T_2 is especially remarkable in SM according to the intense dehydration suffered throughout the process. ST and BF are very similar (Figure 2; Table 2).

3.2.2. Apparent diffusion coefficient

The apparent diffusion coefficient (ADC) is a measure of the average translational motion of water molecules. ADC maps are shown in Figure 2.C. Water in a free environment can easily spread in all directions. In biological tissues, the moisture content is compartmentalized by cell walls and protein structures that condition its mobility. In this way, the destruction of these biological barriers is reflected by an increase in the ADC values (Wheeler-Kingshott et al., 2003).

Throughout ripening a decrease in *ADC* was observed in almost every of the considered times, except during the salting and post salting stages, in which an increase of *ADC* occurred due to salt-induced osmotic effect and protein solubilization. The higher *ADC* value for SM ($0.89 \cdot 10^{-3} \pm 0.05 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$) was reached during the salting stage due to its direct contact with the added salt at this time. The inner location of muscles BF and ST make the salt uptake slower and is not even reached the resting phase when a higher diffusion of water is observed ($0.77 \cdot 10^{-3} \pm 0.07 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ in BF and $0.76 \cdot 10^{-3} \pm 0.04 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ in ST).

As the process progresses, the restricted diffusive motion of water (low *ADC*) is observed. The water that remains after dehydration is strongly linked by myofibrillar structures. This retention is favoured by the presence of salt in the middle, since salt absorption is related to higher water holding capacity and protein solubilisation. Both phenomena, dehydration and salt uptake, result in a gradually descent of *ADC* that reaches the minimum value at the end of the manufacturing process ($0.03 \cdot 10^{-3} \pm 0.01 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ in BF; $0.008 \cdot 10^{-3} \pm 0.002 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ in SM and $0.02 \cdot 10^{-3} \pm 0.002 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ in ST). As expected, *ADC* temporal changes were more pronounced in SM due to its external location, whereas the values in BF and ST were very close, not finding significant differences ($p > 0.05$) between both muscles for the same processing time. Although ST is a muscle with higher fat content, fat had not led a barrier to water diffusion.

Drying and salting, however, did not affect significantly to the T_2 relaxation time values because the contribution of the myofibrillar water on this parameter is much larger than the input of another more mobile water populations, that would be the more involved in the above-mentioned *ADC* increase. In the post-salting stage, when dehydration was stronger, both parameters, T_2 and *ADC*, decreased, suggesting a remarkable loss of water in the whole product.

3.3. Evolution of rheological behavior

Values of rheological parameters obtained from the texture profile analysis (TPA) are shown in Table 3. Significant differences ($p < 0.05$) were found between different stages of the process and between the three studied muscles. In dry-cured ham, texture is a characteristic directly related to the muscle structure, especially related to the degradation of myofibrillar protein and collagen as well as to the intramuscular fat content and drying rate (Toldrá, 1998).

In accordance with previous studies, Monin et al., 1997, Serra et al. 2005, hardness increased during ripening. When lower water activity and water content values were reached, hardness increased significantly. Similarly, it also varies the chewiness since it is a secondary textural characteristic (product of hardness x cohesiveness x elasticity). Salt could also increase the stability and rigidity of the myofibrillar muscle structure since stiffness is increased by mineralization. In the three muscles considered, a progressive trend was observed and the maximum value of hardness and chewiness was reached at the end of the ripening. The muscle that kept the highest hardness and chewiness values throughout the process was SM, followed by BF and finally ST, the softest and the weakest of the three muscles studied. ST showed higher fat content, lower mineralization level due to its intern location and medium moisture level that

Table 3. Texture parameters of Biceps femoris (BF), Semimembranosus (SM) and Semitendinosus (ST) muscles in different stages of the dry-cured ham manufacturing process

Muscle type	Sample	Hardness (N)	Springiness (10^{-3} m)	Cohesiveness	Gumminess (N)	Chewiness (10^{-2} J)	Adhesiveness (N s)
BF	Raw	6.98±1.79 d, α	1.22±0.60 b, α	0.51±0.06 ab, α	3.72±0.87d, α	0.45±0.12 c, α	-0.83±0.20 ab, $\alpha\beta$
	Salted	14.62±2.18 cd, α	1.41±0.30 ab, α	0.54±0.03 a, α	8.33±1.07 bc, α	1.17±0.26 b, α	-0.35±0.19 a, α
	Postsalted	10.76±0.74 c, α	1.77±0.44 ab, α	0.52±0.03 ab, β	5.52±0.68cd, α	0.98±0.25 b, α	-0.42±0.15 a, α
	Half-cured (6 months)	13.29±0.22 c, β	2.04±0.55 ab, α	0.56±0.12 ab, α	7.34±1.19 bcd, β	1.54±0.65 b, $\alpha\beta$	-2.09±0.63 c, β
	Half-cured (8 months)	19.46±1.74 b, α	1.80±0.21 ab, β	0.50±0.01 ab, β	10.17±1.71b, α	1.83±0.25 b, α	-1.32±0.03 b, β
	Ageing (12 months)	19.74±1.23 b, β	2.32±0.45 a, α	0.49±0.04 ab, β	9.07±0.76 bc, β	2.11±0.48 b, β	-1.41±0.48 b, α
	Ageing (20 months)	39.40±4.44 a, β	2.29±0.81 a, α	0.58±0.14 a, α	21.57±4.98 a, β	5.21±1.71 a, α	-0.43±0.17 a, α
SM	Raw	6.55±0.20 d, $\alpha\beta$	0.14±0.09 c, β	0.59±0.07 ab, α	3.78±0.47 c, α	0.06±0.02 e, β	-1.43±0.41 c, β
	Salted	6.71±0.97 d, β	0.17±0.04 c, β	0.60±0.06 ab, α	3.97±0.54 c, β	0.07±0.02 e, β	-1.37±0.35 c, β
	Postsalted	10.67±1.32 d, α	1.74±0.48 b, α	0.46±0.003 bc, β	5.28±0.99 c, α	0.95±0.10 d, α	-0.77±0.34ab, $\alpha\beta$
	Half-cured (6 months)	26.20±0.61 c, α	2.71±0.91 a, α	0.56±0.04 bc, α	12.00±3.30 c, α	3.64±1.93 c, α	-0.94±0.35bc, α
	Half-cured (8 months)	16.56±1.75 cd, α	3.27±0.37 a, α	0.38±0.02 d, α	6.42±1.09 c, β	2.12±0.59 c, α	-0.63±0.20d, β
	Ageing (12 months)	54.52±4.91b, α	1.94±0.15 b, α	0.49±0.02 cd, β	25.90±3.93 b, α	5.06±1.05 b, α	-0.75±0.22ab, α
	Ageing (20 months)	99.30±21.31 a, α	1.57±0.22 b, α	0.63±0.03 a, α	62.07±16.68 a, α	10.08±4.01 a, α	-0.33±0.16 a, α
ST	Raw	4.69±0.19 e, β	0.42±0.10 b, β	0.49±0.03 bc, α	2.56±0.27 d, β	0.11±0.04 d, β	-0.30±0.51 a, α
	Salted	7.34±1.36 d, β	0.38±0.19 b, β	0.54±0.02 ab, α	4.22±1.57 cd, β	0.18±0.08 d, β	-0.43±0.15 a, α
	Postsalted	9.72±1.80 c, α	0.51±0.33 b, β	0.58±0.06 ab, α	5.92±1.29 c, α	0.33±0.21 d, α	-1.15±0.06b, β
	Half-cured (6 months)	10.23±0.75 c, χ	2.16±0.80a, α	0.48±0.04 bc, α	4.93±0.62 c, α	1.01±0.46 c, β	-1.38±0.30b, $\alpha\beta$
	Half-cured (8 months)	10.84±0.72 c, β	2.33±0.51 a, β	0.48±0.03 bc, β	5.31±0.86 c, β	1.26±0.41 bc, α	-1.44±0.19b, α
	Ageing (12 months)	19.04±0.70 b, β	2.10±0.40 a, α	0.54±0.04 a, α	10.36±1.33 b, β	2.19±0.56 b, β	-1.02±0.50b, α
	Ageing (20 months)	32.67±2.08 a, β	2.15±0.53a, α	0.57±0.03 a, α	18.41±1.36 a, β	4.01±1.23 a, α	-0.27±0.09a, α

a, b: values in the same column for a same muscle with different lyrics differ significantly ($P<0.05$) (differences in a same muscle throughout the process)

α , β : values in the same column for the same curing stage of different muscles with different lyrics differ significantly ($P<0.05$) (differences between muscles throughout the process)

cause a lower mechanical resistance in that muscle compared with BF and, especially with SM, characterized for an intense dehydration.

According to Serra et al., 2005, cohesiveness and springiness showed a positive linear relationship with a_w and moisture content. With increasing dehydration, cohesiveness (extent to which a material can be deformed before it ruptures) and springiness (rate at which a deformed material goes back to its initial form after the deforming force is removed) were reduced. SM presented also the higher values for cohesiveness and springiness during the process. The adhesiveness (degree to which the surface of the ham muscles adheres to the palate during chewing process) not experienced regular changes during ripening. In each of the three muscles studied, a decrease in adhesiveness since raw ham to cured ham was observed, although there was not a progressive reduction. BF resulted to be the one presenting the lower value of adhesiveness at the end of the process.

3.3. Relationship between MRI parameters and physicochemical characteristics

3.4.1. MRI parameters versus water and salt contents

For all the considered muscles, multiple linear regressions were performed using the water and salt contents, as dependent variables, and MRI parameters (T_1 , T_2 and ADC) as independent variables (Table 4).

A highly significant multiple linear regression was found between water content ($R^2=0.973$ for BF; $R^2=0.980$ for SM and $R^2=0.975$ for ST; $p < 0.05$) and MRI parameters. Salt content is also highly correlated with MRI parameters ($R^2=0.994$ for BF; $R^2=0.959$ for SM and $R^2=0.990$ for ST; $p < 0.05$).

These relations correspond to salt kinetics, drain and reverse flow of moisture that takes place from the outside of the ham (represented by SM) and the interior (related through BF and ST). The possibility of MRI non-destructively monitoring water content and NaCl concentrations in cured ham was previously addressed by other authors. Guiheneuf et al., 1996 achieved quantitative maps of cured pork samples based on MRI parameters such as T_1 , T_2 and proton density, showing a decrease for these parameters in pork samples cured with increasing NaCl amounts. Linear relationships ($p < 0.0001$) were found between muscle water and salt content and MRI T_1 and T_2 parameters in *Longissimus dorsi* muscle salted with different NaCl percentages. (Fantazzini, 2005). Multiple regression analysis was also used to compute a model fitting salt content in ST and BF of Parma ham. T_1 , T_2 , their ratio T_1/T_2 and proton density S_0 were used to establish this model. Salt content resulted to be highly correlated with MRI parameters ($R^2=0.90$, $p < 0.001$) (Fantazzinni, 2009).

Results of the multivariate analysis confirm that MRI parameters (T_1 , T_2 and ADC) were relevant for constructing multiple regression models to predict water and salt content for cured ham.

Table 4. Multiple linear regression analysis of physicochemical characteristics (water content and salt content) versus MRI parameters (T_1 , T_2 and ADC) of ham

Dependent variable	Muscle type	R^2	SE	Independent variable	Regression coefficient	t- values
Water content	BF	0.973	0.987	Constant	44.350	64.532
				T_1	0.005	3.188
				T_2	0.431	8.226
				ADC	3.060	3.613
	SM	0.980	1.989	Constant	18.691	16.705
				T_1	0.016	2.842
				T_2	0.688	4.377
				ADC	5.291	4.110
	ST	0.975	1.326	Constant	31.818	28.314
				T_1	0.007	2.236
				T_2	0.612	5.528
				ADC	4.773	3.596
Salt content	BF	0.994	0.205	Constant	8.021	11.460
				T_1	-0.003	-5.887
				T_2	-0.005	-0.217
				ADC	-4.968	-6.236
	SM	0.959	0.245	Constant	16.236	13.764
				T_1	0.0004	2.867
				T_2	-0.096	-2.845
				ADC	10.819	4.756
	ST	0.990	0.212	Constant	8.815	10.510
				T_1	-0.004	-4.073
				T_2	-0.022	-0.979
				ADC	-3.302	-3.712

R^2 = coefficient of determination (adjusted for degrees of freedom); SE = standard error; $P < 0.0$

MRI parameters are related to water and salt content and distribution, so the results obtained by regression analysis are in accordance with those obtained by other authors throughout the curing process (Monin et al.1997, Serra et al. 2005).

3.4.2. Relationship between MRI parameters and rheological characteristics

In order to allow a closer examination of how textural response of muscle is related to their structural organization, the relation among textural features and MRI parameters (T_1 and T_2 relaxation times and ADC) was studied. To this end, response surface model was calculated because it is more flexible and it can take a large variety of functional forms.

The surface models were obtained to estimate the response function for the parameters procured directly from TPA (hardness, springiness, adhesiveness, and cohesiveness). Secondary attributes (gumminess and chewiness) were not considered. The regression model with significant ($P < 0.05$) regression coefficients are showed in Table 5. An example of the estimated response surfaces obtained for each muscle (BF, ST and SM), considering an ADC value of $0.5 \cdot 10^{-3}$ (mm^2/s) are plotted in Figure S1.

Overall, high regression coefficients for all TPA parameters of the three studied muscles were obtained (Table 5), definitely due to the relationship between MRI parameters and muscle structure, which determines its rheological behaviour (Romero de Ávila et al., 2014). Differences in the regression models reflect different degree of muscle affectation by the dry-curing manufacturing process, mainly due to the anatomical morphology characteristics and the chemical composition (mostly the amount of collagen and intramuscular fat). ST is located in a deeper layer of the ham and although BF is more external, it is surrounded on the outside by a thick layer of fat, which reduces its water loss. SM occupies more external positions and would therefore be subject to the greatest degrees of dehydration (Romero de Ávila et al., 2014). BF, in comparison to SM and ST, presents the highest collagen content.

To determine sample standard deviation between predicted values and observed values, the RMSE was calculated for each TPA parameter of the three muscles (Table 5). The results confirmed acceptable goodness of fit of the model for TPA parameters of each muscles of ham.

Table 5. Estimated response surface model relating textural properties to magnetic resonance image (MRI) parameters of different muscle [biceps femoris (BF), semitendinosus (ST), and semimembranosus (SM)] in different stages of the dry-cured ham manufacturing process.

Muscle type	Regression models	R^2 (percent)	R^2 adjusted for d.f. (percent)	P	RMSE
BF	Hardness = $38.58 + 0.13 \cdot T_1 - 5.07 \cdot T_2 + 254.63 \cdot ADC + 0.34 \cdot T_2^2 - 0.01 \cdot T_1 \cdot T_2 + 2.05 \cdot T_1 \cdot ADC - 63.23 \cdot T_2 \cdot ADC$	97.44	96.06	0.0000	
	Cohesiveness = $1.02 - 0.09 \cdot T_2 + 19.67 \cdot ADC + 0.000002 \cdot T_1^2 + 0.006 \cdot T_2^2 + 7.76 \cdot ADC^2 - 0.0002 \cdot T_1 \cdot T_2 + 0.02 \cdot T_1 \cdot ADC - 1.43 \cdot T_2 \cdot ADC + 0.0003 \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot ADC$	91.01	83.65	0.0000	
	Springiness = $-4.48 + 0.01 \cdot T_1 - 0.34 \cdot T_2 + 245.19 \cdot ADC + 0.03 \cdot T_2^2 + 36.40 \cdot ADC^2 - 0.0009 \cdot T_1 \cdot T_2 - 12.05 \cdot T_2 \cdot ADC + 0.004 \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot ADC$	87.06	78.43	0.001	
	Adhesiveness = $3.32 - 0.38 \cdot T_2 + 31.26 \cdot ADC + 0.00001 \cdot T_1^2 + 0.04 \cdot T_2^2 - 0.002 \cdot T_1 \cdot T_2 + 0.21 \cdot T_1 \cdot ADC - 6.49 \cdot T_2 \cdot ADC$	94.66	91.78	0.0000	
SM	Hardness = $305.08 - 0.57 \cdot T_1 + 0.0002 \cdot T_1^2 + 0.08 \cdot T_2^2 + 0.02 \cdot T_1 \cdot ADC$	92.34	90.29	0.0000	
	Cohesiveness = $1.21 - 0.001 \cdot T_1 - 2.93 \cdot ADC + 0.000004 \cdot T_1^2 + 0.004 \cdot T_2^2 - 0.0002 \cdot T_1 \cdot T_2 + 0.005 \cdot T_1 \cdot ADC - 0.00006 \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot ADC$	83.31	74.32	0.001	
	Springiness = $-5.43 + 0.61 \cdot T_2 - 14.31 \cdot ADC + 0.00007 \cdot T_1^2 + 0.05 \cdot T_2^2 + 13.27 \cdot ADC^2 - 0.004 \cdot T_1 \cdot T_2$	95.55	93.64	0.001	
	Adhesiveness = $-0.36 - 0.007 \cdot T_1 + 0.21 \cdot T_2 + 0.00003 \cdot T_1^2 + 0.03 \cdot T_2^2 + 9.82 \cdot ADC^2 - 0.002 \cdot T_1 \cdot T_2 - 0.42 \cdot T_2 \cdot ADC + 0.0002 \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot ADC$	86.94	78.23	0.005	
ST	Hardness = $-92.43 + 0.26 \cdot T_1 - 1.47 \cdot T_2 + 609.53 \cdot ADC + 0.06 \cdot T_2^2 - 90.69 \cdot ADC^2 - 0.00579 \cdot T_1 \cdot T_2 - 0.55 \cdot T_1 \cdot ADC - 13.49 \cdot T_2 \cdot ADC + 0.01 \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot ADC$	99.70	99.44	0.0000	
	Cohesiveness = $0.04 + 0.0008 \cdot T_1 + 3.12 \cdot ADC - 0.0003 \cdot T_2^2 - 0.003 \cdot T_1 \cdot ADC - 0.05 \cdot T_2 \cdot ADC + 0.00006 \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot ADC$	92.20	88.59	0.005	
	Springiness = $-28.62 + 0.05 \cdot T_1 + 0.50 \cdot T_2 + 89.03 \cdot ADC - 18.40 \cdot ADC^2 - 0.001 \cdot T_1 \cdot T_2 - 0.10 \cdot T_1 \cdot ADC - 1.93 \cdot T_2 \cdot ADC + 0.002 \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot ADC$	93.27	88.78	0.0001	
	Adhesiveness = $-12.88 + 0.02 \cdot T_1 + 53.66 \cdot ADC - 10.70 \cdot ADC^2 - 0.0003 \cdot T_1 \cdot T_2 - 0.06 \cdot T_1 \cdot ADC - 0.81 \cdot T_2 \cdot ADC + 0.001 \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot ADC$	92.90	89.08	0.0001	

 R^2 = coefficient of determination. P -value for R^2 was determined using F-test.

RMSE: Root Mean Square Error

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (X_{pred} - X_{obs})^2}{n}}$$

4. Conclusions

MRI has proven to be a suitable tool in order to study structural changes during ham manufacturing process, since T_1 , T_2 and ADC parameters allow getting complete information of the studied tissues. The multivariate analysis confirms that MRI parameters could be used to construct regression models to predict water and salt content and TPA parameters. Therefore, with only non-destructive MRI analyses it could be possible to obtain structural, physicochemical and textural information. This type of predictive models was accurate enough to consider MRI as a useful tool for monitoring and optimizing dry cured ham manufacturing process.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of UCM-BSCH Group 920176GR35/10A, project AGL2010-19158 funded by the Spanish Secretary of State of Research, Development and Innovation within the Ministry of Economy and Competitiveness. A.B.G.G. was awarded a grant (BES-2011-047485) from the same institution.

References

- Aliño, M., Grau, R., Toldrá, F., Barat, J.M. (2010). Physicochemical changes in dry-cured hams salted with potassium, calcium and magnesium chloride as a partial replacement for sodium chloride. *Meat Science* 86, 331-336.
- Arnau, J. & Gou, P. (2001). Effect of air relative humidity on ham rind and subcutaneous salted fat during the resting period. *Meat Science*, 58, 65-68.
- Arnau, J., Guerrero, L., Casademont, G. & Gou, P. (1995). Physical and chemical changes in different zones of normal and PSE dry-cured ham during processing. *Food Chemistry*, 52, 63-69.
- Benedini, R., Parolari, G., Toscani, T., Virgili, R. (2012). Sensory and texture properties of Italian typical dry-cured hams as related to maturation time and salt content. *Meat Science*, 90, 431-437.
- Bonny, J. M., Laurent, W., Labas, R., Taylor, R., Berge, P., Renou, J. P. (2000). Magnetic resonance imaging of connective tissue: A non-destructive method for characterizing muscle structure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 337-341.
- Boulby, P. A. & Rugg-Gunn, F. (2003). T2: The transverse relaxation time. In: P. Tofts (Ed.), Quantitative MRI of the brain. Measuring changes caused by disease (pp. 143-173). West Sussex, England: John Wiley & Sons.
- Cernadas, E., Carrion, P., Rodriguez, P. G., Muriel, E., Antequera, T. (2005). Analyzing magnetic resonance images of Iberian pork loin to predict its sensorial characteristics. *Computer Vision and Image Understanding*, 98, 344-360.
- Charlton, J. A. (2009). High resolution NMR analysis of complex mixtures. In: M. Gudjónsdóttir, P. S. Belton, & G. A. Webb (Eds.), Magnetic resonance in food science: challenges in a changing world (pp. 3-12). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Fantazzini, P., Bortolotti, V., Garavaglia, C., Gombia, M., Riccardi, S., Schembri, P. (2005). Magnetic resonance imaging and relaxation analysis to predict noninvasively and non-destructively salt-to-moisture ratios in dry-cured ham. *Magnetic Resonance Imaging*, 23, 359-361.
- Fantazzini, P., Gombia, M., Schembri, P., Simoncini, N., Virgili, R. (2009). Use of magnetic resonance imaging for monitoring Parma dry-cured ham processing. *Meat Science*, 82, 219-27.
- Fernández, M., Ordóñez, J.A., Cambero, I., Santos, C., Pin, C., de la Hoz, L. (2007). Fatty acid composition of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. *Food Chemistry*, 101, 107-112.
- Foegeding, E. A., Brown, J., Drake, M. A., Daubert, C. R. (2003). Review. Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *International Dairy Journal*, 13, 585-591.
- Gowland, P.A.; Stevenson, V.L. (2003). T1: The longitudinal relaxation time. In: Quantitative MRI of the brain. Measuring changes caused by disease. (pp. 111-143). Ed. John Wiley & Sons, West Sussex, England.
- Guiheneuf, T. M., Tessier, J. J., Herrod, N. J., Hall, L. D. (1996). Magnetic resonance imaging of meat products: Automated quantitation of the NMR relaxation parameters of cured pork, by both bulk NMR and MRI methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71, 163-173.
- Guiheneuf, T. M., Parker, A. D., Tessier, J. J., Hall, L. D. (1997). Authentication of the effect of freezing/thawing of pork by quantitative magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 35, 112-118.
- Hanson, S.W.F. & Olley J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89, 101-102.
- Herrero, A. M., Cambero, M. I., Ordonez, J. A., Castejon, D., Romero de Avila, M. D., de la Hoz, L. (2007). Magnetic resonance imaging, rheological properties, and physicochemical characteristics of meat systems with fibrinogen and thrombin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9357-9364.

- Herrero, A.M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Castejón, D., Romero de Ávila, M.D., Cambero, M.I. (2009). Magnetic resonance imaging studies of the cold-set gelation on plasma powder and meat systems. *Food Research International*, 42, 1362-1372.
- Kim, J. H., Seong, P. N., Cho, S. H., Park, B. Y., Hah, K. H., Yu, L. H., Lim, D. G., Hwang, I. H., Kim, D. H., Lee, J. L., Ahn, C. N. (2008). Characterization of nutritional value for twenty-one pork muscles. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, 21, 138-144.
- Laurent, W., Bonny, J. M. & Renou, J. P. (2000). Muscle characterization by NMR imaging and spectroscopic techniques. *Food Chemistry*, 69, 419-426.
- Marcone, M.F., Wuang, S., Albabish, W., Nie, S., Somnarain, D., Hill, A. (2013). Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. *Food Research International*, 51, 729-747.
- Mitchell, A. D., Scholz, A. M., Wang, P. C., Song, H. (2001). Body composition analysis of the pig by magnetic resonance imaging. *Journal of Animal Science*, 79, 1800-1813.
- Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martin, J.F., Cornet, M., Lanore, D., Grasso, F. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Science*, 47, 29-47.
- Manzocco, L., Anese, M., Marzona, S., Innocente, N., Lagazio, C., Nicoli, M.C. (2013). Monitoring dry-curing of S. Daniele ham by magnetic resonance imaging. *Food Chemistry*, 141, 2246-2252.
- Morales, R., Serra, X., Guerrero, L., Gou, P. (2007a). Instrumental evaluation of defective texture in dry-cured hams. *Meat Science*, 76, 536-542.
- Morales, R., Serra, X., Guerrero, L., Gou, P. (2007b). Softness in dry-cured porcine biceps femoris muscles in relation to meat quality characteristics and processing conditions. *Meat Science* 77, 662-669.
- Renou, J. P., Foucat, L., & Bonny, J. M. (2003). Magnetic resonance imaging studies of water interactions in meat. *Food Chemistry*, 82, 35-39.
- Romero de Ávila, M.D., Escudero, R., Ordóñez, J.A., Cambero, M.I. (2014). Weibull analysis characterizes the breaking properties of dry-cured ham slices. *Meat Science*, 97, 451-458.
- Ruiz-Cabrera, M.A., Gou, P., Foucat, L., Renou, J.P., Daudin, J.D. (2004). Water transfer analysis in pork meat supported by NMR imaging. *Meat Science*, 67, 169-78.
- Santos, C., Hoz, L., Cambero, I., Cabeza, C., Ordóñez, J.A. (2008). Enrichment of dry cured ham with α -linolenic acid and α -tocopherol by the use of linseed oil and α -tocopheryl acetate in pig diets. *Meat Science*, 80, 668-674.
- Segura, J., Escudero, R., Romero de Ávila, M.D., Cambero, M.I., López-Bote, C.J. (2015). Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat. *Meat Science*, 103, 90-95.
- Serra, X., Ruiz-Ramirez, J., Arnau, J., Gou, P. (2005). Texture parameters of dry-cured ham, muscle *biceps femoris* samples, dried at different levels as a function of water activity and water content. *Meat Science*, 69, 249-54.
- Shaarani, S. M., Nott, K. P., & Hall, L. D. (2006). Combination of NMR and MRI quantitation of structure and structure changes for convection cooking of fresh chicken meat. *Meat Science*, 72, 398-403.
- Simpson, N.E., Grant, S.C., Blackband, S.J., Constantinidis, I. (2003). NMR properties of alginate microbeads. *Biomaterials*, 24, 4941-4948.
- Tabilo, G., Flores, M., Fiszman, S.M., Toldrá, F. (1999). Postmortem meat quality and sex affect textural properties and protein breakdown of dry-cured ham. *Meat Science*, 51, 255-260.
- Tingle, J. M., Pope, J. M., Baumgartner, P. A., Sarafis, V. (1995). Magnetic resonance imaging of fat and muscle distribution in meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 30, 437-446.
- Toldrá, F. & Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry-cured ham. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 38, 331-52.

Toldrá, F. (1998). Desarrollo de las características de textura y flavor: contribución enzimática. In: International Congress of Meat Science and Technology, 44,42-54. Barcelona. Simposio Especial.

Wheeler-Kingshott, A. M., Barker, G. J., Steens, S. C. A., Van Buchem, M. (2003). ADC: The diffusion of water. In P. Tofts (Ed.), Quantitative MRI of the brain. Measuring changes caused by disease (pp. 203–210). West Sussex, England: John Wiley

SUPPLEMENTARY MATERIAL

(2 pages)

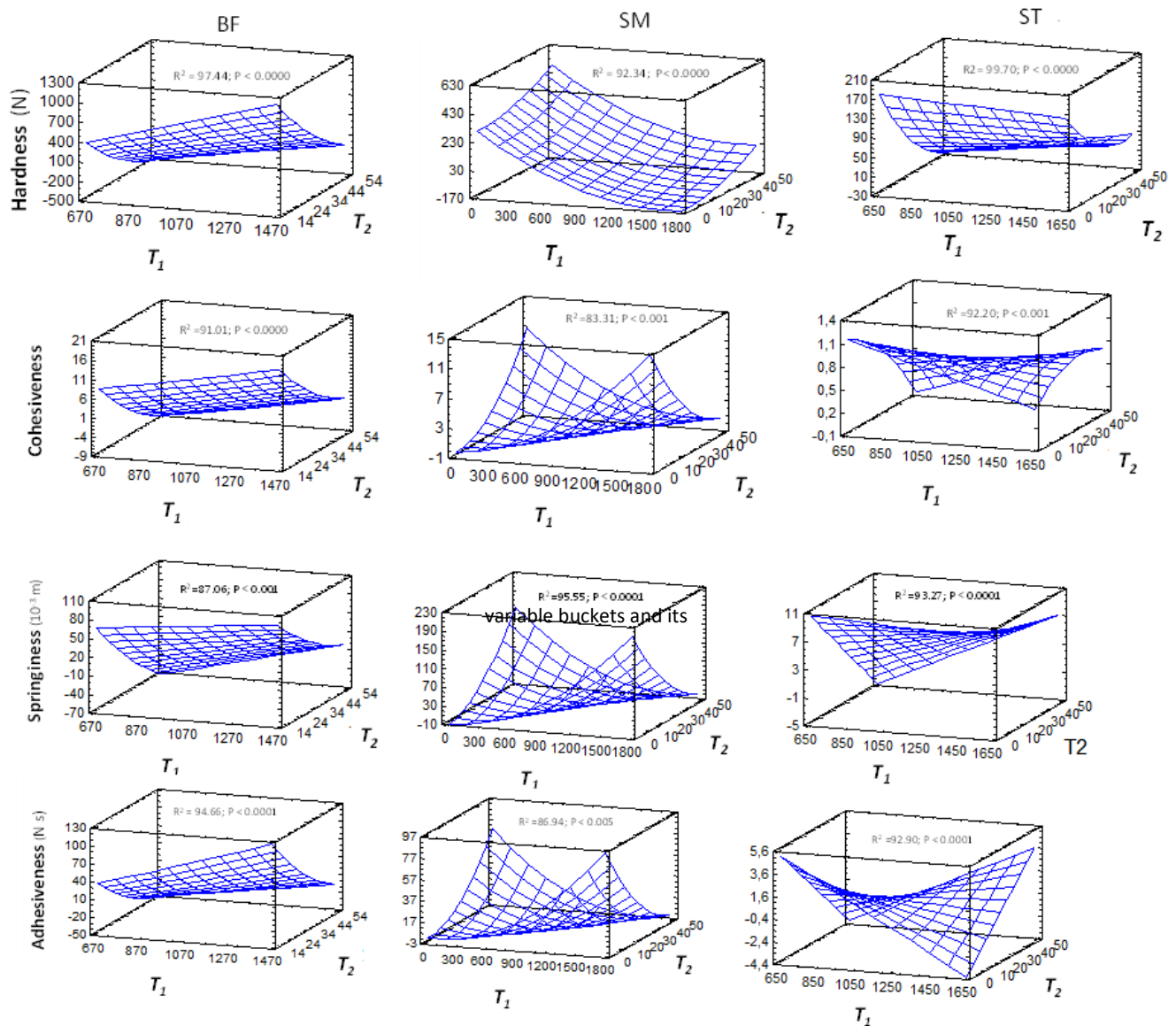
Manuscript entitled: Use of MRI as a Predictive Tool for Physicochemical and Rheological Features During Cured Ham Manufacturing.

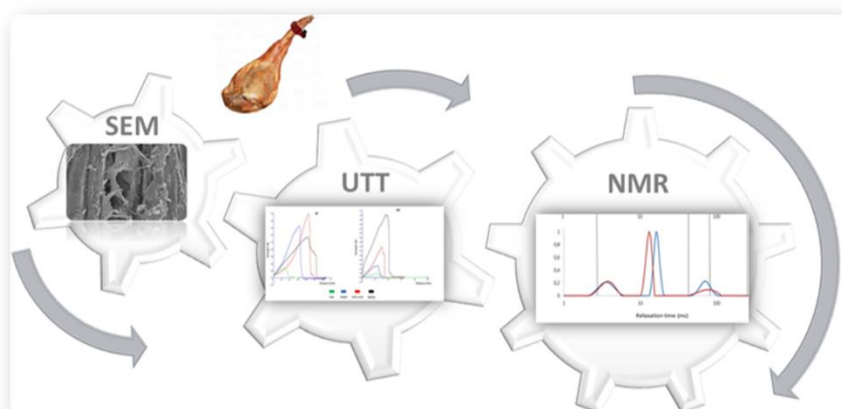
A.B. García-García, M. E. Fernández-Valle, D. Castejón, R. Escudero, M. I. Cambero.

Table of contents

1). Figure S1. Relation among textural features and transverse relaxation time (T_2 , ms) and longitudinal relaxation time (T_1 , ms) obtained by Magnetic resonance image (MRI) of different muscle [<i>biceps femoris</i> (BF), semitendinosus (ST), and <i>semimembranosus</i> (SM)] in different stages of the dry-cured ham manufacturing process (considering an apparent diffusion coefficient value of $0.5 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$).....	p.28
---	------

- 1) **Figure S1.** Relation among textural features and transverse relaxation time (T_2 , ms) and longitudinal relaxation time (T_1 , ms) obtained by Magnetic resonance image (MRI) of different muscle [*biceps femoris* (BF), *semitendinosus* (ST), and *semimembranosus* (SM)] in different stages of the dry-cured ham manufacturing process (considering an apparent diffusion coefficient value of $0.5 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2/\text{s}$)





Trabajo 2

Estudio comparado de la microestructura de jamón curado mediante relaxometría T_2 de RMN, microscopía electrónica de barrido (MEB) y ensayos de tracción uniaxial.

Enviado a *Food Structure*

En el **Trabajo 2** se plantea un estudio preliminar de la microestructura de jamón curado. Para ello, se obtuvo información a partir de diversas técnicas de análisis para conseguir un enfoque multidisciplinar. Varias unidades de jamón curado fueron analizadas a distintos tiempos de maduración mediante relaxometría de RMN para evaluar la variación de la relajación transversal T_2 en respuesta a la adición de sal y a la deshidratación en los dos músculos más representativos (bíceps femoral y semimembranoso). A lo largo de la maduración se observaron cambios en la movilidad y la distribución de agua y en la infiltración grasa. Se identificaron distintas poblaciones T_2 : T_{2b} , T_{21} , T_{22} y $T_{2'}$. El cambio de la población principal, T_{21} , hacia tiempos de relajación más cortos indica mayor grado de inmovilización del agua y se relaciona con el aumento de la consistencia de la matriz cárnica. Los resultados de RMN obtenidos, apoyados por las imágenes de MEB, sugieren que la maduración favorece la consolidación y compactación de la estructura de jamón y conduce al desarrollo de una matriz miofibrilar altamente organizada en la cual el agua queda atrapada en el interior del entramado tridimensional proteico. La infiltración grasa se hizo visible por medio de la aparición de la población $T_{2'}$ durante la etapa de secado, cuya presencia se relacionó con los protones asociados con la fase grasa. Los valores de la fuerza de rotura y el límite elástico, calculados mediante la realización de ensayos destructivos de tracción uniaxial, se vieron afectados por la maduración y cambiaron en función del grado de curación de las muestras analizadas, siendo mayores cuanto más avanzado estaba el proceso. La población principal, T_{21} , mostró una relación lineal positiva con el contenido de agua y negativo con la fuerza de rotura.

Por consiguiente, el estudio demostró que la relaxometría de RMN es una técnica prometedora para establecer asociaciones entre el estado biofísico del agua intrínseca y la progresión en el procesado de jamón curado.

Dry Cured-ham Microstructure: a T_2 NMR Relaxometry, SEM and Uniaxial Tensile Test Combined Study.

A.B. García-García^a, M.I. Cambero^{a*}, D. Castejón, R. Escudero^a, M.E. Fernández-Valle^b

^a) Sección Departamental de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Spain.

^b) Centro de Asistencia a la Investigación de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico. Universidad Complutense de Madrid. 28040. Madrid. Spain.

*Corresponding author. Tel: +34 913943745; Fax: +34 913943743; E-mail: icambero@vet.ucm.es

Abstract: NMR relaxation analyses were performed on dry-cured hams at different processing times to evaluate the ranges of variation of ^1H transverse relaxation time (T_2) in representative ham muscle tissues, due to dehydration and salt uptake. Changes in the mobility and distribution of water and fat marbling were detected throughout ripening. Three to four different ^1H populations were identified: T_{2b} , T_{21} , T_{22} and $T_{2'}$. The shift of the main population, T_{21} , toward faster relaxation times indicates a higher degree of immobilization of water, and the change is related to the increase in the consistency of the meat matrix. NMR results, supported by SEM images, suggest that ripening favors the compaction of ham structure and leads to a high organized myofibrillar matrix in which the remaining water is trapped within the protein tridimensional network. Fat marbling became visible through the emergence of $T_{2'}$ population during the maturing stage, whose presence is linked to protons related to the fat phase. Breaking strength and elastic stress limit values for BF and SM muscles changed according with the extent to which they are affected by the curing process. The main water population, T_{21} showed a positive linear relationship with water content and it was negative related with the breaking strength. Consequently, the study demonstrated that NMR T_2 relaxometry is a promising technique to elucidate associations between the biophysical state of intrinsic water and progression in processing of dry-cured ham.

Key words: dry-cured ham, microstructure, T_2 relaxometry, uniaxial tensile test

1. Introduction

Foods are complex, dynamical and heterogeneous mixtures of macromolecules, solutes and solvent (including water). This complex structure gives rise to three states of water; 'structural' or 'bound' water, water which is hydrogen-bonded inside the grooves and cavities of proteins and polysaccharides; 'surface' water, water at the biopolymer surface having a dynamic state agitated by the presence of the surface; and the third state is bulk water (Fullerton & Cameron, 1988; Hills, Manning & Ridge, 1996). Thus, the distribution of water in the different states is highly dependent on the microstructure of the food, which can be altered by changing formulation, processing and storage conditions. However, the water availability for chemical and biochemical reactions depends on the type of interaction it might have with the food constituents. This close relationship between microstructure and water also influences the textural and other quality attributes; among others, by the plasticising effect of water influencing the physical states of foods, such as solubilisation, softening due to melting, glassy-to-rubbery transition and staling (Cornejo & Chinachoti, 2003; Hermansson, 1983; Mathlouthi, 2001; Ruan & Chen, 1998). Because of this intimate relationship between water, food quality and food safety, a more complete understanding of water and its properties, behavior and influence, alone and in foods, is of prime importance.

In this regard, dry-cured ham is a whole muscle product whose processing involves dehydration and salting of the raw pieces and the final attributes of the product depends on the proper development of the techniques and procedures (Toldrá, 2006). A profound knowledge about water mobility and distribution during ripening is essential to improve industrial ham manufacturing.

Nuclear magnetic resonance (NMR) relaxometry is a widely used method in food science with the ability to provide information about the mobility and compartmentalization of water and about molecular interactions between water and myofibrillar components (Bertram, Dønstrup, Karlsson, & Andersen, 2001; Bertram & Andersen, 2004). Thus, NMR relaxometry is able to provide detailed information about the water in meat and thereby give a measure of the water availability, which is decisive for food stability and safety (Bertram et al., 2001; Bertram, Purslow, & Andersen, 2002). In the other hand, the rheological behavior of the product is highly related to textural properties and, therefore, it determines technological usages and consumers' acceptance. Among the essential methods that can be used to study the rheological behavior, the tensile test is the best suited for structural investigations (Purslow, 1985). The performance of this test allows obtaining a load deformation curve to complete rupture, in which the fracture strength corresponds to the maximum force supported by the material (Romero de Ávila, Escudero, Ordóñez & Cambero, 2014). The data obtained by tensile test offer complementary valuable information about muscles behavior by applying a tensile stress force and how this external force affect meat structure.

The aim of this work was to investigate the potential use of NMR transverse relaxation time (T_2) as a technique capable of monitoring local changes occurring in dry-cured ham during processing and affecting the quality of the final product, mainly related to salt and moisture content and marbling fat amount and distribution. A detailed study of the microstructure of the product

was completed by the acquisition of SEM images, together with the characterization of the breaking strength and elastic stress limit for each of the muscles and stages considered.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection during ham processing

Samples of a total of 35 hams were taken at different steps of the manufacturing process: raw (3 days after slaughter), during salting (after salt addition, in the first 2-3 days of processing), post-salting (hams taken during the resting period after salt removal), maturing (half-cured hams taken after 8 months of processing) and ageing (fully matured hams after 20 months of processing). Salting and post-salting were managed at low temperature (0-4 °C); two different processing conditions were established during maturing: a cold period (13-15 °C, RH: 75-85%) and a warm period (22-26 °C, RH: 60-75%) and ageing was performed at room temperature (12-17 °C, RH: 60-80), in conformity with Santos et al., 2008. Two different muscle types, corresponding to different anatomical locations [*biceps femoris* (BF) and *semimembranosus* (SM)] were considered for analysis. The hams from white-breed pigs, (Landrace x Large White female animals slaughtered at 100-120 kg live weight), were purchased from a local manufacturing plant. Manufacturing process and sample collection was carried out according to García-García et al (2018).

The water content was determined by drying the sample at 110 °C to constant weight and the results were expressed as a percentage (AOAC, 2006).

2.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Cubic samples (5 x 5 x 5 mm³) were obtained by cutting lengthwise to the muscle fibres from the interior of the meat piece with a stainless-steel cutter. The samples obtained were fixed in a solution of 2.5% glutaraldehyde in saline solution (diluted in 0.9% saline solution) for 4 h at 4 °C. The fixed samples were washed 3 times with saline solution and then dehydrated in incremental concentrations of ethanol (30%, 50%, 70%, 90%, 95% and 100%) (ethanol/water, v/v) for 30 min/step and ultradehydrated by critical point with CO₂. Then, they were covered with graphite, gold-coated and observed in a JEOL JSM 6400 Scanning Electron microscope (Jeol, Tokio, Japan) at 15 kV and working distance of 25 mm.

2.3. NMR measurements: T₂ relaxometry

Transverse relaxation (T_2) measurements were obtained using a Biospec BMT 47/40 spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany), operating a 4.7 T and equipped with a 6 cm gradient system. Samples (approximately 3 cm long, 2 cm wide and 1.5 cm thick) were placed in a 3.5 cm Bruker-designed volume radio frequency coil, used for transmission and reception.

T₂ data were measured, without gradients, that is, from the whole sample, using a Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) sequence. A total of 256 echoes with an echo time (TE) of 2 ms were generated. However, only the even echoes were registered and used for the T_2 distributions

calculation, thus, the effective echo time was 4 ms. The distributions were obtained using UpenWin 1.01 (Università di Bologna, Bologna, Italy).

A preliminary T₂ relaxometry study was performed in ham pieces, so one single analysis for each ripening stage and muscle type was completed.

2.4. Uniaxial tensile tests

3-6 slices were obtained from each one of the studied muscles using a TYPE ES 300 Model DOM (Beckers, Italia) instrument. Slices with surface imperfections that could be a starting point of rupture were discarded. At least, three pieces were cut from each slice. To standardize sampling and in accordance with previous works (Herrero et al. 2007; Herrero et al., 2008; Romero de Ávila, Escudero, Ordóñez & Cambero, 2014) these pieces were cut in a dumbbell shape, approximately 4.0 x 1.0 cm² in the narrowest zone and 0.2 cm thickness per sample. All samples were cut parallel to the fibre direction. For analysis, one tensile grip (A/MGT) was fixed to the base of the textural analyser, while the other one was attached to the load cell. Initial grip separation was 15.0 mm and crosshead speed was 1.0 mm/s until rupture. A load cell of 5 kg was used to perform all the analysis. Each sample was placed between both tensile grips on the textural analyzer. Rupture force was taken as the maximum force peak height (N) required to break the sample. Breaking strength (N/cm²) was calculated by dividing the rupture force by the crosssectional area (thickness*width) of the portions (Honikel, 1998; Romero de Ávila et al., 2014). Measurements were carried out at room temperature. Tensile tests were performed using a TA.XT2i SMS Stable micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the Texture Exponent 32, 6.0.7.0. version.

2.5. Statistical analysis

Data are presented as the means and standard deviations (SD). Differences among means were established by ANOVA and Duncan's multiple comparison procedure using Statgraphic Centurion XVI para Windows (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, EE.UU.). Simple regression analyses, using a Durbin–Watson statistic tests, at 95% of confidence level, were performed to determine the relationships between data.

3. Results

3.1. SEM images

SEM images (Figure 1) showed changes in the myofibrillar matrix during dry-cured ham processing according to the two mechanisms mainly involved in ripening: salting and dehydration. Raw ham showed the characteristic structure of skeletal muscle. The muscle fibers remain intact, with clearly distinguishable and well-defined muscle packages. Most of the water from the meat is trapped by the myofibrils, between fine strands of actin and thick myosin (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). Similar comments can be made in both muscles, but SM showed less presence of perimysium. The progress of ripening produced the degradation of muscle structure, especially by alteration of the sarcolemma, dehydration of the sarcoplasm and structural modification of miofibrillar packages. These results are in agreement with other authors (Larrea et al., 2007a) in

salted meat. The post-salted hams were analyzed immediately after brushing the surface salt, therefore these images show the effect of salt on the structure of the meat.

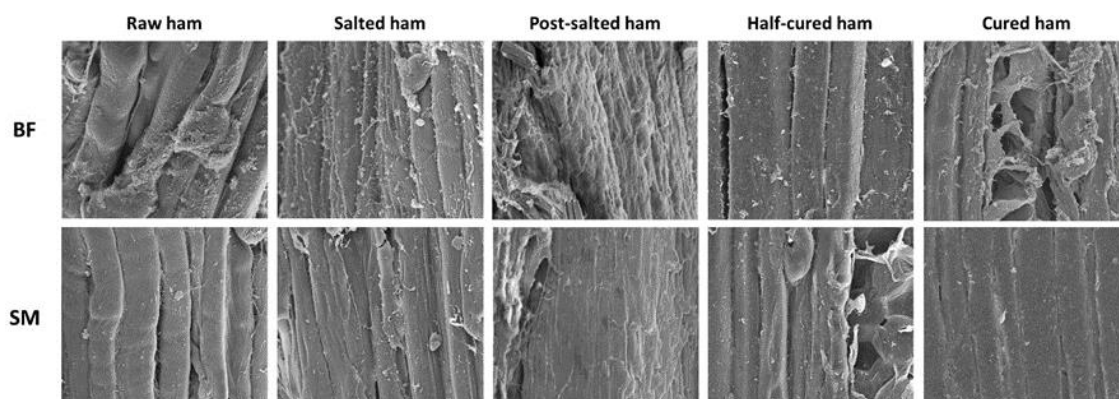


Figure 1. SEM images (300x) obtained for the two considered muscles [*biceps femoris* (BF) and *semimembranosus* (SM)] at different processing stages. Micrographs corresponding to raw, salted, post-salted, half-cured and cured hams are shown)

Muscle packages experienced a slight swelling during this stage due to the property of salt to increase the CRA, due to the shift of the isoelectric point of myofibrillar protein towards lower values (Albarracín, Sánchez, Grau & Barat, 2011). The separation between bundles of muscle fibers is not as clear and the fibers are not as sharp due to the degradation of cell membranes and the solubilization of myofibrillar proteins by the effect of salt, especially in SM. Maturing and ageing images mainly show the dehydration effect favored by the conditions of humidity and temperature of the ripening rooms. The bundles of muscle fibers are much less distinguishable and its diameter decreased due to water loss. Towards the end of ripening, the boundaries between bundles of muscle fibers are hardly visible, favored by the lipolytic and proteolytic phenomena that occur during these phases. The products generated are deposited in the inter-muscular spaces (Larrea et al., 2007b) creating a sort of amorphous matrix between bundles of muscle fibers. Especially notable is this effect in SM. BF is maintained to a greater extent fibrillar structure, being possible to appreciate the packages of muscle fibers surrounded by connective tissue (perimysium) dehydrated. The result is a characteristic structure of porous appearance.

3.2. T_2 measurements

T_2 distributed data (Figure 2) revealed the existence of four different T_2 populations in dry-cured samples, depending on the degree of association of the protons of the sample with the protein matrix. T_{2b} population, with a fast relaxation time, between 1-10 ms, is related to protons strongly linked to macromolecules, with a high degree of association to the matrix. The main population, T_{21} , with a relaxation time around 50 ms in fresh meat, is related to protons located within highly organized structures and corresponds to the water retained by the three-dimensional network of myofibrillar proteins. T_{22} population, with slower relaxation time, more than 300 ms, is related to the most mobile protons located in extramiofibrillar spaces. These three components have been previously described in the fresh meat (Bertram, Dønstrup, Karlsson & Andersen,

2001; Bertram et al., 2001; Bertram & Andersen, 2004; Andersen, Andersen, & Bertram, 2006) and also in dry-cured ham (Fantazzini et al., 2009).

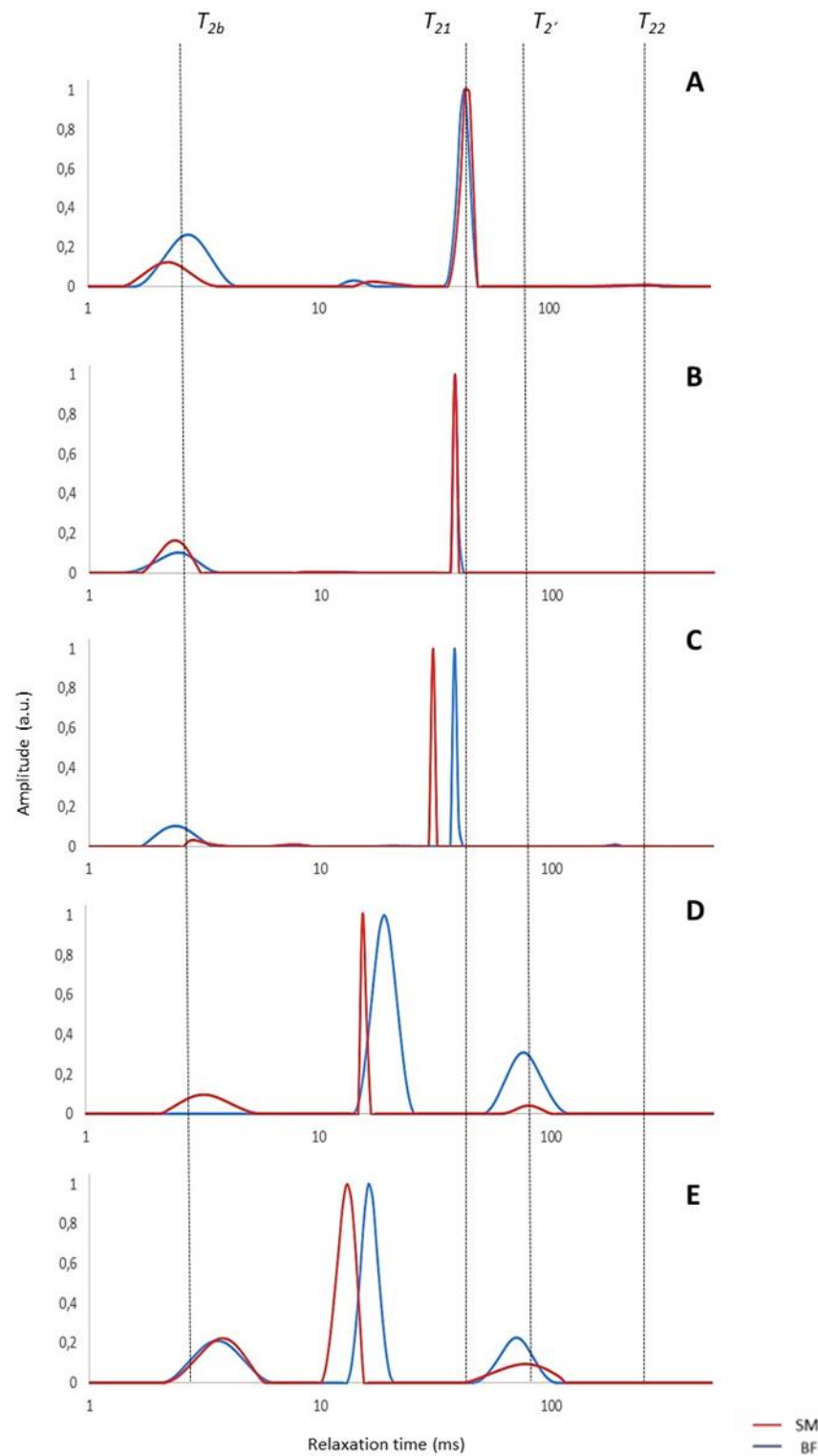


Figure 2. NMR T_2 distributed data obtained for *biceps femoris* (BF) and *semimembranosus* (SM) muscles at different processing times. A: raw ham. B: salted ham. C: post-salted ham. D: Half-cured ham. E: Cured ham.

Moreover, it should be noted the emergence of a new signal during maturing, T_2 population, with a relaxation time of 80 ms approximately, not covered so far in the literature. To the authors' knowledge, this is the first time that this signal has been associated with the protons of the fat phase given that, at this point in the process, the infiltration degree of fat in the muscle matrix has reach an important progress. The progress of ripening is reflected in the distributions obtained, enabling the monitoring of the process. On the one hand, the dehydration of the protein matrix manifested itself through changes in the protons distribution and mobility, so that a shift towards T_2 shorter relaxation times was observed, especially notable in the main component T_{21} , and related to the extinction of T_{22} population. This shift is related to a greater degree of binding of the protons with the matrix, which suggests a higher degree of matrix compaction as the process progresses. On the other hand, it was possible to observe changes in the distribution of fat, due to the emergence of the T_2 signal, whose presence can be used as a marker for later stages of processing. SEM images were of great help to interpret structural modifications. Their analysis allowed to observe the reduction of the intrinsic size of pore of the protein matrix, due to the phenomena of protein solubility, absorption of salt and dehydration, typical of curing, as well as the display of the evolution of fat marbling in the muscle. In addition, differences in behavior between muscles, were detected since the effect of ripening was more evident in SM muscle.

The T_{21} component distributions obtained for this muscle from the post-salting stage presented faster relaxation times in comparison with the BF, suggesting that the ripening phenomena affected faster to SM muscle, since it is an outer muscle, with direct contact with the air, which determine the accelerated effects of the dynamics of diffusion of water and salt in this muscle. Based on a previous work (García-García et al., 2018), the obtained values of moisture were used in the present study to establish correlations between physicochemical parameters and T_2 NMR measurements. A linear correlation model between the main water population (T_{21}) and the water content for BF and SM muscles was calculated. A strong linear positive dependence was found between both variables, suggesting that T_{21} population is a highly valuable parameter to monitor the undergoing of the ripening process. The linear correlation models obtained were:

$$\text{water content BF (g H}_2\text{O/100 g of product)} = 0.64 (T_{21}) + 42.69 (R^2 = 0.71)$$

$$\text{water content SM (g H}_2\text{O/100 g of product)} = 1.12 (T_{21}) + 25.31 (R^2 = 0.98)$$

3.3. Tensile tests

Breaking strength (mean values and standard deviations) obtained by tensile testing of BF and SM muscle are given in Table 1. In general, SM showed higher values (ranging from 2.169 ± 0.235 to 39.499 ± 1.454) than BF (from 4.327 ± 1.025 to 21.243 ± 0.719), which is in accordance to those detected by other authors (Herrero et al., 2007; Herrero et al., 2008; Hoz et al., 2008; Romero de Ávila, Escudero, Ordóñez & Cambero, 2014).

Table 1. Parameters obtained from tensile tests for biceps femoris (BF) and semimembranosus (SM) in different stages of the curing process

Muscle type	Curing stage	Breaking strenght (Ncm ⁻²)	Elastic stress limit (Ncm ⁻²)
BF	Raw	4.327 ± 1.025 d, α	3.365 ± 0.392 d, α
	Salted	10.946 ± 1.048 c, α	8.087 ± 0.989 c, α
	Postsalted	5.577 ± 0.394 d, β	3.766 ± 0.294 d, β
	Half-cured (8 months)	20.582 ± 1.992 a, β	14.743 ± 1.292 a, β
	Ageing (20 months)	11.420 ± 1.173 c, β	4.107 ± 0.587 d, β
SM	Raw	2.169 ± 0.235 e, β	1.831 ± 0.216 e, β
	Salted	5.731 ± 0.771 d, β	4.534 ± 0.530 c, β
	Postsalted	8.140 ± 0.657 c, α	5.123 ± 0.935 c, α
	Half-cured (8 months)	28.850 ± 2.499 b, α	20.233 ± 1.687 b, α
	Ageing (20 months)	39.499 ± 1.454 a, α	26.542 ± 1.415 a, α

a, b: values in the same column for a same muscle with different lyrics differ significantly ($P < 0.05$) (differences in a same muscle throughout the process)

α, β: values in the same column for the same curing stage of different muscles with different lyrics differ significantly ($P < 0.05$) (differences between muscles throughout the process)

The breaking strength of the two studied muscles (Ncm⁻²) increased significantly ($P > 0.05$) throughout the curing process. SM muscle was the most resistant, presenting the higher breaking strength. This behavior suggests that rupture of the muscle would take place along several lines of weakness in the bundles of muscle fibers, by successive microfractures in the muscle fibers and in the destructure of intramuscular connective tissue (Romero de Ávila, Escudero, Ordóñez & Cambero, 2014). The enlargement in resistance in BF was much smaller than the one showed by SM (the first tripled the value while in the second one was 20 times higher in cured than in fresh meat). In both cases, this growing is associated with an increase in the elastic limit, point above tissue deformation is irreversible. These results relate the increase of toughness with the moisture loss and would be associated with data provided by other authors in different tissues (Zeugolis, Paul, & Attenburrow, 2008; Jager & Fratzl, 2000; Landis, Librizzi, Dunn, & Silver, 1995). Similarly, it has been reported that salt could increase the stability and rigidity of the myofibrillar muscle structure (Andrés et al., 2004; Ruiz-Ramírez, Arnau, Serra, & Gou, 2005).

When a tensile test was applied, the resultant internal strains were absorbed causing a characteristic deformation in each muscle tissue and strength-distance curves with different shapes were obtained (Figure 3). Their analysis reveals a different mechanical behavior for BF and SM. The form of the curves for each muscle can be related to several factors such as morphology characteristics (Maltin, Balcerzak, Tilley, & Delday, 2003), sarcomere length (Serra, Ruiz-Ramírez, Arnau, & Gou, 2005), intramuscular fat and connective contents (Serra, Ruiz-Ramírez, Arnau, & Gou, 2005) and proteolytic activity (Parolari, Virgili, & Schivazappa, 1994).

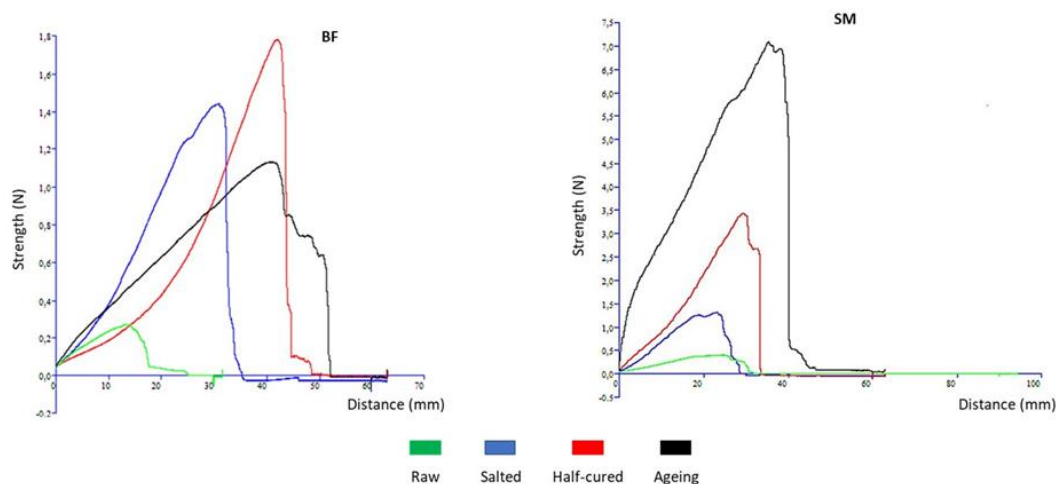


Figure 3. Evolution of strength-distance curves obtained by means of uniaxial tensile test for *biceps femoris* (BF) and *semimembranosus* (SM) at different ripening stages.

Depending on the position of the muscle on the leg, the processing stage can also determine the form of the obtained curves. BF experienced an increase of the breaking strength during salting and drying and a slight decline during ageing. Samples reach the breaking point after an elastic period, without a phase of plastic behavior. The shape of the curves changed during ripening and a change in the slope was observed. SM curves are characterized by a period of elastic deformation, which concludes with the break of the stressed sample. Modification of the slope in this case is less remarkable than in BF, although the breaking strength increase is progressive and most notably, reaching its maximum towards the end of the ripening. As it is known, meat myofibrillar proteins have great influence on the structural and rheological properties of food. BF myofibrillar degradation which takes place during ripening is slower than the degradation experienced by SM due to its internal localization (slower loss of moisture and late diffusion of salt), so properties as elasticity or the water holding capacity make stress behavior different for the SM and BF muscles. At the end of the process, inside the product is still a three-dimensional protein structure, while in the surface moisture loss has been more pronounced and muscular structure is compact, the spaces between myofibrils are reduced and there is no retained water. As a result, by applying tension forces, SM muscle, more compact structurally, suffers less deformation than BF.

This finding agrees with a previous work, Romero de Ávila, Escudero, Ordóñez & Cambero, 2014, where stress-strain curves were obtained for different tissues of dry-cured ham in order to provide a complete characterization of the mechanical behavior of this product.

SEM images resulted very helpful to understand what happens at the microstructural level by applying tension forces. Figure 4 shows the behavior of BF muscle fibers with a representative strength-distance curve obtained in a stress test. In the first part of the curve (area between A and B) the applied force is proportional to the deformation suffered by the sample, establishing the region of linear deformation or elastic region. From point B, the deformation ceases to be linear and the elastic limit is reached. From then on, the increase of tensile stress also increases the

deformation but not proportionally, reaching the peak of maximum force (C), from which the stress begins to descend while the deformation continues the breaking point is reached.

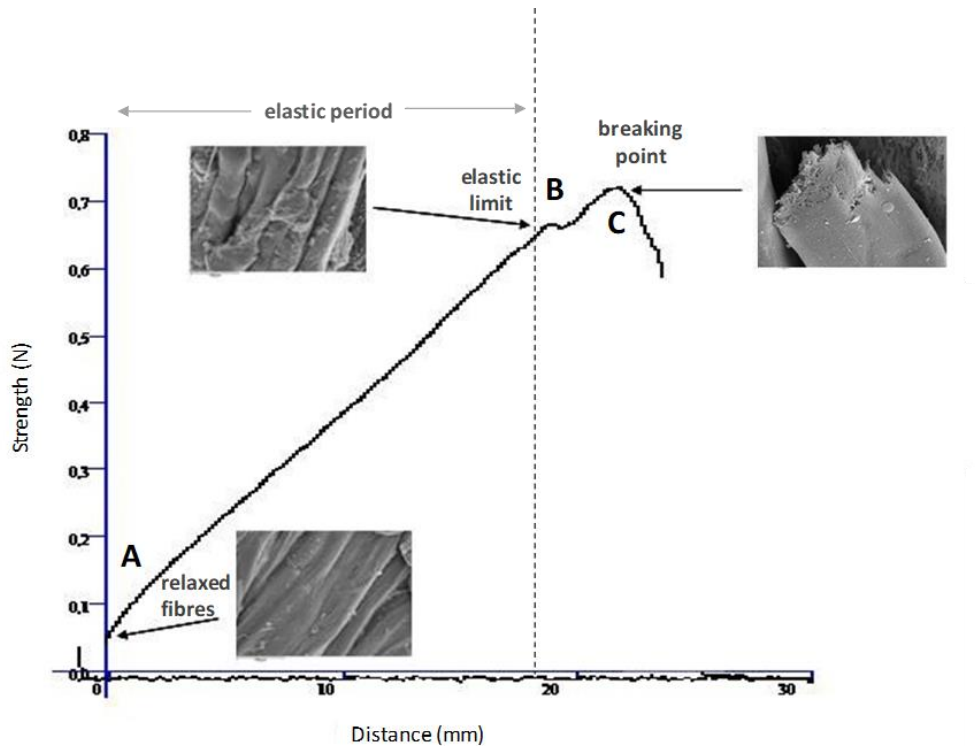


Figure 4. Evolution of *biceps femoris* (BF) muscular fibers behavior during an uniaxial tensile test.

SEM was also used to study the changes suffered by fresh and cured muscles when they were subjected to the action of an external force of tensile stress. The stretching of SM muscle fibers during the elastic period followed by their fully breaking is shown in Figure 5. The stretching is most evident in fresh muscle, while in the cured one, due to the degradation of the myofibrillar structure stretching effect is less noticeable. Especially striking is the structural difference which can be seen when looking at the inner surface of a broken fiber bundle. Myofibrils can be distinguished in fresh muscle, but not in the cured muscle, in which the fibers package is a compact mass.

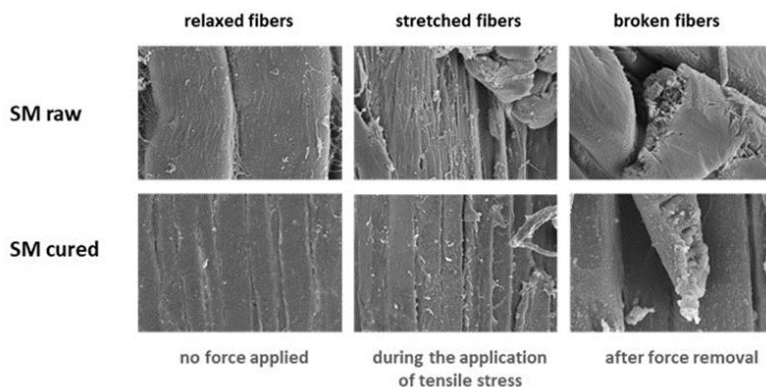


Figure 5. SEM images illustrate the evolution of semimembranosus (SM) microstructure by applying a tensile stress force. Relaxed and stretched fibers are magnified 300x and broken fibers, 1000x.

As previously mentioned, microstructural changes in dry-cured ham during ripening are mainly linked to salting and dehydration. In this regard, the main water population detected by NMR relaxometry, T_{21} , has demonstrated to be positive related to water content, therefore, it is possible to follow the course of ripening by analyzing this NMR parameter. In this context, it is predictable that T_{21} population have an inverse relationship with the breaking strength. Figure 6 shows the evolution of both parameters, T_{21} population and breaking strength, during ripening for the two studied muscles. The breaking strength is maximum when T_{21} values are minimum, which suggests an antagonistic behavior of both variables. Short relaxation times involve matrix compaction, therefore, more integrity and less plasticity of the tissue, which require the application of higher external stress forces to get the breaking point.

The results obtained here suggest that dehydration, expressed in T_{21} terms, had a marked effect on the mechanical properties of dry cured ham muscular matrix. It should be mentioned that the breaking strength for the two studied muscles showed a linear relationship with T_{21} , especially for SM muscle (Figure 6). This finding is related to the dehydration and salting dynamics in muscle tissues, since BF is located in a deeper layer of the ham and it is surrounded in the outside by a thick layer of fat which reduces its water loss (Romero de Ávila, Escudero, Ordóñez & Cambero, 2014), while SM occupies more external positions and would therefore be subjected to the greatest degrees of dehydration and salt uptake. On the other hand, the intrinsic properties of each muscle should be considered to explain their behavior: BF, in comparison to SM, presents higher collagen content (Wheeler, Shakelford & Koomaraie, 2000) and it is a high proteolyzed muscle which stays softer at the end of ripening (Parolari, Virgili, & Schivazappa, 1994).

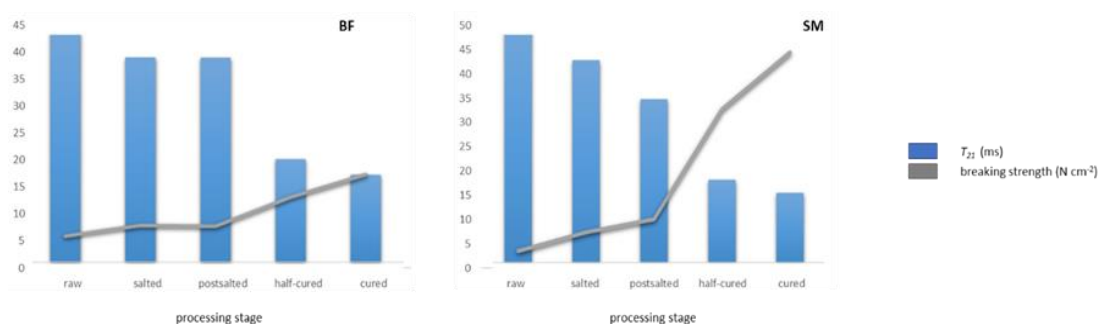


Figure 6. T_{21} population and breaking strength evolution during ripening for biceps femoris (BF) and semimembranosus (SM) muscles.

4. Conclusions

Changes in water mobility and distribution during dry-cured ham processing can be analyzed by means of NMR T_2 relaxometry. Drying induced a notable shift toward shorter T_{21} relaxation times related to the dehydration process, salt uptake and the consolidation of a firmer meat matrix. The mentioned shift was especially notable from the post-salted stage in SM, suggesting that this external muscle underwent a faster ripening than BF. The emergence of the T_2 population during

the maturing stage was linked to protons related to the fat phase and to the progress of fat marbling.

Moreover, the main population, T_{21} showed a strong positive linear dependence with water content and it was negative related to the evolution of the breaking strength during processing.

The study has demonstrated the potential of NMR T_2 relaxometry to elucidate associations between the biophysical state of intrinsic water and processing of dry-cured ham, being possible to monitor the whole manufacturing process.

Acknowledgments

The present work received financial support from project AGL2010-19158 funded by the Spanish Secretary of State of Research, Development and Innovation within the Ministry of Economy and Competitiveness. A.B.G.G. was awarded a grant (BES-2011-047485) from the same institution.

References

- Albarracin, W., Sánchez, I.C., Grau, R., & Barat, J.M. (2011). Salt in food processing; usage and reduction: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1329-1336.
- Andersen, R.H., Andersen, H.J., & Bertram, H.C. (2007). Curing-induced water mobility and distribution within intra- and extra-miofibrillar spaces of three pork qualities. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1059-1066.
- Andrés, A., Cava, R., Ventanas, J., Thovar, V., & Ruiz, J. (2004). Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of salt content and processing conditions. *Meat Science*, 68, 45-51.
- AOAC (2006). Official methods of analysis (18th ed.). Washington D. C.: Association of Official Analytical Chemists.
- Bertram, H.C., Dønstrup, S., Karlsson, A.H., & Andersen, H.J. (2001). Continuous distribution analysis of T₂ relaxation in meat- an approach in the determination of water holding capacity. *Meat Science*, 60, 279-285.
- Bertram, H.C., Karlsson, A.H., Rasmussen, M., Pedersen, O.D., & Andersen, H.J. (2001). Origin of multiexponential T₂ relaxation in muscle myowater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3092-3100.
- Bertram, H.C., Purslow, P.P., & Andersen, H.J. (2002). Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: a low-field nuclear magnetic resonance study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 824-829.
- Bertram, H.C., & Andersen, H.J. (2004). Applications of NMR in meat science. *Annual Report on NMR Spectroscopy*, 53, 158-202.
- Cornejo, F., & Chinachoti, P. (2003). NMR in foods: opportunity and challenges. in Magnetic Resonance in Food Science: Latest Developments. P. S. Belton, A. M. Gil, G. A. Webb, and D. Rutledge, ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Fantazzini, P., Gombia, M., Schembri, P., Simoncini, N., & Virgili, R. (2009). Use of magnetic resonance imaging for monitoring Parma dry-cured ham processing. *Meat Science*, 82, 219-27.
- Fullerton, G. D., & Cameron, I. L. (1988). Relaxation of Biological Tissues. Pages 115-155 in Biomedical Magnetic Resonance Imaging. F. W. Werhli, D. Shaw, and J. B. Kneeland, ed. VCH Publishers Inc., New York.
- García-García, A.B., Fernández-Valle, M.E., Castejón, D., Escudero, R., Cambero, M.I. (2018). Use of MRI as a predictive tool for physicochemical and rheological features during cured ham manufacturing. *Meat Science* (under revision)
- Hermansson, A. M. (1983). Protein functionality and its relation to food microstructure. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 32(3), 369-388.
- Herrero, A.M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Herranz, B., Romero de Ávila, M.D., & Cambero, M.I. (2007). Breaking strength of dry-fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77, 331-338.
- Herrero, A.M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Herranz, B., Romero de Ávila, M.D., & Cambero, M.I. (2008). Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 80, 690-696.
- Hills, B. P., Manning, C. E., & Ridge, Y. (1996). New theory of water activity in heterogeneous systems. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 92(6), 979-983.
- Honikel, K.O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49, 447-457.
- Hoz, L., Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Herrero, A.M., & Ordóñez, J.A. (2008). Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packaged dry-cured ham by E-beam irradiation. *Journal of Food Protection*, 71, 2001-2006.
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. (2005). Mechanisms of waterholding capacity of meat: the role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71, 194-204.
- Jager, I., & Fratz, P. (2000). Mineralized collagen fibrils: A mechanical model with a staggered arrangement of mineral particles. *Biophysics Journal*, 79, 1737-1746.

Landis, W., J., Librizzi, J.J., Dunn, M.G., & Silver, F.H. (1995). A study of the relationship between mineral content and mechanical properties of turkey gastrocnemius tendon. *Journal of Bone Mineral Research*, 10, 859-867.

Larrea, V., Perez-Munuera, I., Hernando, I., Quiles, A., & Lluch, M.A. (2007a). Chemical and structural changes in lipids during the ripening of Teruel dry-cured ham. *Food Chemistry*, 102, 494-503.

Larrea, V., Perez-Munuera, I., Hernando, I., Quiles, A., Llorca, E., & Lluch, M.A. (2007b). Microstructural changes in Teruel dry-cured ham during processing. *Meat Science*, 76, 574-82.

Maltin, C., Balcerzak, D., Tilley, R., & Delday, M. (2003). Determinants of meat quality: Tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 337-347.

Mathlouthi, M. (2001). Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. *Food Control*, 12, 409-417.

Parolari, G., Virgili, R., & Schivazappa, C. (1994). Relationship between cathepsin B activity and compositional parameters in dry-cured hams of normal and defective texture. *Meat Science*, 38, 117-122.

Purslow, P. (1985). The physical basis of meat structure: Observations on the fracture behavior of cooked bovine *M. semitendinosus*. *Meat Science*, 12, 39-60.

Romero de Ávila, M.D., Escudero, R., Ordóñez, J.A., & Cambero, M.I. (2014). Weibull analysis characterizes the breaking properties of dry-cured ham slices. *Meat Science*, 97, 451-458.

Ruan, R. R., & Chen, P. L. (1998). *Water in Foods and Biological Materials: A Nuclear Magnetic Resonance Approach*. 1st edition ed. Technomic Publishing Company, Inc, Lancaster, Pennsylvania.

Ruiz-Ramírez, J., Arnau, J., Serra, X., & Gou, P. (2005). Relationship between water content, NaCl content, pH and texture parameters in dry-cured muscles. *Meat Science*, 70, 579-587.

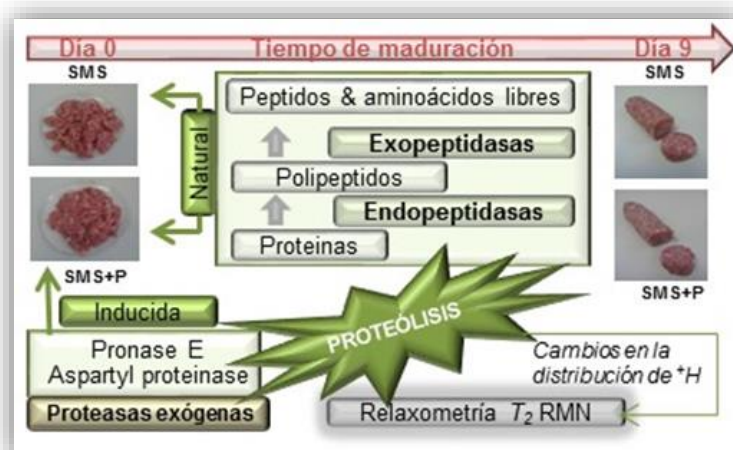
Santos, C., Hoz, L., Cambero, M.I., Cabeza, C., & Ordóñez, J.A. (2008). Enrichment of dry-cured ham with α -linolenic acid and α -tocopherol by the use of linseed oil and α -tocopheryl acetate in pig diets. *Meat Science*, 80, 668-674.

Serra, X., Ruiz-Ramírez, J., Arnau, J., & Gou, P. (2005). Texture parameters of dry-cured ham m. *biceps femoris* samples dried at different levels as a function of water activity and water content. *Meat Science*, 69, 249-254.

Toldrá, F. (2006). Dry-cured ham. En: *Handbook of Food Science Technology and Engineering*. Ed. CRC Press, Boca Raton, E.E.U.U.: pp 164.1-164.11

Wheeler, T.L., Shakedord, S.D., & Koohmaraie, M. (2000). Variations in proteolysis, sarcomere length, collagen content, and tenderness among major pork muscles. *Journal of Animal Science*, 78, 958-965.

Zeugolis, D.I., Paul, R.G., & Attenburrow, G. (2008). Post-self-assembly experimentation on extruded collagen fibers for tissue engineering applications. *Acta Biomaterials*, 4, 1646-1656.



Trabajo 3

Estudio del proceso de proteólisis durante la maduración de modelos cárnicos elaborados a base de carne picada

Publicado en *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (2015), 3039-3045

La relaxometría T_2 de RMN tiene un gran potencial para el estudio de las dinámicas de distribución y movilidad de agua en alimentos y posibilita la identificación de distintas poblaciones de protones en la muestra en función de su grado de interacción con la matriz, lo cual aporta información de la microestructura de la muestra, a través de la elucidación de la compartimentación de la matriz en estudio. Los miosistemas son productos proteicos constituidos principalmente por proteínas miofibrilares, las cuales condicionan sus propiedades, tanto desde el punto de vista organoléptico como tecnológico. En el **Trabajo 3** se plantea el estudio del proceso de proteólisis que tiene lugar durante la maduración de modelos cárnicos elaborados a partir de carne cerdo y que es especialmente relevante para conseguir las características del producto final. Para ello, se elaboraron, de forma tradicional, dos lotes de modelos cárnicos, con (SMS) y sin proteasas (SMS+P), con el fin de estudiar mediante relaxometría T_2 las diferencias en la microestructura de los dos tipos de productos generados. Se realizaron además análisis electroforéticos con el fin de comparar el perfil de degradación de las fracciones proteicas en ambos lotes. El comportamiento de degradación fue bastante diferente (mucho más intenso en el lote con proteasas), así como las distribuciones de los tiempos de relajación T_2 obtenidas para cada lote. En ambos casos, se identificaron distintas poblaciones de protones (T_{2b} , T_{21} , T_{22}) que experimentaron cambios durante la maduración, reduciéndose los tiempos de relajación a medida que avanzó el proceso. Estructuralmente, los modelos con proteasas se caracterizaron por matrices más fluidas y mucho menos organizadas, lo cual se puso de manifiesto a través de las poblaciones T_{2b} y T_{22} .

Este estudio revela el potencial de la relaxometría T_2 para monitorizar el proceso de maduración de modelos cárnicos, así como su aptitud para evaluar el efecto estructural de la adición de proteasas a la masa cárnica.

Proteolysis Process in Fermented Sausage Model Systems As Studied by NMR Relaxometry

Ana Belén García García,[†] Lotte Bach Larsen,[§] María Isabel Cambero Rodríguez,[†] Karen Paola Cruz Díaz,[†] and Hanne Christine Bertram^{*,§}

[†]Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

[§]Department of Food Science, Aarhus University, Research Centre Aarslev, Kirstinebjergvej 10, DK-5792 Årlev, Denmark

ABSTRACT: Proton NMR relaxation analyses were performed in sausage model systems (SMS) at different manufacturing times (0, 1, 3, 5, 7, and 9 days) to evaluate changes in water distribution and mobility. Three different water populations were identified, T_{2b} (5–10 ms), T_{21} (30–70 ms), and T_{22} (100–300 ms), and the progress of ripening could be followed as a shift toward shorter relaxation times. In addition, the combined effect of adding commercial proteases (Pronase E and aspartyl proteinase) on protein breakdown and structural integrity of sausage models (SMS+P) was investigated, resulting in the formation of a more fluid and less organized meat matrix that led to changes in water populations T_{2b2} and T_{22} compared with SMS. A very different protein degradation pattern between SMS and SMS+P was observed by means of SDS-PAGE and fluorescamine assay, supporting that some degree of protein aggregation is needed for the presence of the T_{22} population in fermented sausages.

KEYWORDS: sausage models, ripening, proteases, NMR relaxation, water distribution, meat fermentation

INTRODUCTION

In many foods the intrinsic distribution and mobility of water in meat have a profound influence on essential quality attributes such as juiciness, tenderness, firmness, and appearance.¹ Fermented meat sausage manufacture entails three main steps: formulation, fermentation, and ripening/drying.² During these stages, different technological processes such as chopping, salting, and pH decline result in changes in the structure of the native muscle proteins that may affect water properties.³ It is well-known that compounds resulting from protein breakdown and those generated from amino acid transformation are involved in flavor development in meat products.⁴ One of the most established methods for accelerating the ripening of fermented products involves the addition of exogenous proteases to accelerate the reactions that modify texture and generate flavor.^{5,6} Consequently, it is essential to elucidate how these enzymes affect the microstructure and, therefore, the distribution and mobility of water in fermented sausages to understand how the process can be optimized.

Low-field NMR relaxation techniques (LF-NMR) can provide information about the state of water in foods, and numerous applications in a variety of food matrices have been reported.^{7–10} In fresh meat, NMR relaxation data were found to indicate the existence of more than one type of water population.^{11–13} It was also shown that the changes in water attributes as a function of drying as detected by LF-NMR were useful to elucidate the microbial safety of fermented meat products.¹⁴ Nevertheless, knowledge about water properties in fermented sausages is still limited, and no detailed investigations on proteolysis have been reported. Consequently, the aim of this work was to study changes in water mobility and distribution during the manufacturing process of sausage model systems and to elucidate the relationship between proteolysis

and water properties in sausage models by means of low-field NMR. To obtain additional data that may contribute to a further understanding of the relationship between proteolysis and the NMR T_2 relaxation pattern, the study also included sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to study changes in myofibrillar proteins during ripening, because SDS-PAGE has proved to be a suitable tool to study the proteolysis process in fermented sausages.^{15–17}

MATERIALS AND METHODS

Model Formulation and Manufacture. Two different batches of sausage model systems were developed: SMS (model systems without enzyme) and SMS+P (model systems with proteases). SMS with pork (*Longissimus lumborum*) were produced, consisting of (% w/w) minced lean meat, fat (19%), and curing agents [NaCl (2.5%), KNO₃ (0.02%), NaNO₂ (0.01%), dextrose (0.8%), lactose (1%), and dextrin (1.6%)]. SMS meat mixture was treated with Pronase E from *Streptomyces griseus* and aspartyl proteinase from *Aspergillus oryzae* at concentrations of 300/100 enzyme units/kg of meat mixture, respectively, to obtain the SMS+P batch. The protease addition was performed according to previous studies conducted with the use of selective exogenous proteases.^{4,5} The amount of enzyme added in the present study has proved to be suitable to obtain acceptable products with viable final quality attributes. No starter culture was used in order to develop a natural fermentation process. Lean meat and fat were chopped, using an MR-9 mincer (Garhe, Amorebieta, Spain), then mixed with the rest of the ingredients at cool temperature (4 °C), and, after a resting period of 24 h at 4 °C, the sausage mixtures were stuffed into 50 mm diameter collagen casings, in pieces of 400 g. Eighteen independent units were manufactured for each batch and placed in an

Received: February 4, 2015

Revised: March 9, 2015

Accepted: March 9, 2015

Published: March 9, 2015

FED 53 ripening cabinet (Binder, Tuttlingen, Germany) for a period of 9 days. During the first 24 h the units were kept at 22 °C and the relative humidity of 95%. Within 48 h, storage conditions were gradually reduced to 89% humidity and 17 °C. Models were stored at 12 °C the remaining days. Sampling was carried out at different ripening days: 0 (24 h after batter meat preparation and just before stuffing into casings), 1, 3, 5, 7, and 9 days. A total of three units of each batch were collected for each of the studied times. Physicochemical analyses were performed at each sampling time and, in any case, before freezing. Then sausages were vacuum packaged and stored at -20 °C until further analyses.

Physicochemical Analysis. Water activity (a_w), pH, and dry matter (DM) were determined in triplicate samples of each of the considered products and ripening times. Water activity (a_w) was measured using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) at 25 °C. The pH was determined in a homogenate of the sample with distilled water (1:10 w/v). DM was determined by drying the sample at 110 °C to constant weight, and the results were expressed as a percentage.¹⁸

NMR Analyses. Sausage models were thawed prior to NMR analysis. To carry out thawing, samples were kept at room temperature for approximately 6 h. Sausage behavior was similar in both SMS and SMS+P, and syneresis or exudate loss was never observed. Samples (approximately 4 cm long and 1 cm in diameter, weight approximately 5 g) were placed in a cylindrical glass tube (5 cm long by 14 mm diameter). Before measurement, the sausage samples were thermostated to 25 °C in a water bath for 15–20 min. Proton NMR T_2 relaxation measurements were performed on a Maran Benchtop Pulsed NMR Analyzer (Resonance Instruments, Witney, UK) operating at 23.2 MHz and equipped with an 18 mm variable-temperature probe where the cylindrical glass tubes were placed. A total of six replicates of each product and ripening time were analyzed at 25 °C. Transverse relaxation time, T_2 , was measured using the Carr–Purcell–Meiboom–Gill sequence (CPMG)^{19,20} with a τ value (time between 90 °C pulse and 180 °C pulse) of 150 μ s. Data from 4096 echoes were acquired as 16 scan repetitions. The repetition time between two succeeding scans was 2 s. The obtained T_2 data were analyzed using algorithm²¹ and carried out in MatLab (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA) using in-house scripts. Distributed exponential fittings are shown in a plot of relaxation amplitude versus relaxation time, over a predefined range of characteristic relaxation times.

Measurement of Proteolysis. Degree of proteolysis was estimated by measurement of free amino terminal groups using the fluorescamine assay described earlier.²² One hundred milligrams of each sample was solubilized in 1 mL of phosphate-buffered saline (0.05 M phosphate buffer, 0.14 M NaCl, pH 6.7). To 500 μ L of 1.67 M (24%) trichloroacetic acid in water was added an equal volume of solubilized sample, and the mixture was held for 20 min on ice to allow precipitation of intact proteins. The precipitated mixture was centrifuged (17000g for 20 min) and then filtered through a no. 41 filter paper (Whatman PLC, Brentford, UK). A 12.5 μ L aliquot of this filtrate was mixed with 1 mL of 100 mM borate buffer and 500 μ L of 719 μ M fluorescamine in acetone, and 250 μ L was then transferred to each well in a microtiter plate. Fluorescence of the samples was measured, 18 min after the addition of the fluorescamine, at an excitation wavelength of 390 nm and an emission wavelength of 480 nm using a model Synergy 2 Multi-Mode microplate reader (Holm & Halby, Brøndby, Denmark). Quantitation was achieved by calculating leucine equivalents using an external leucine standard curve prepared as follows: a 0.1 M leucine stock solution was made (327.5 mg of leucine in 25 mL of 1 mM HCl), and from the stock solution six different concentrations were made (0.00050–0.0030 M leucine) and mixed with 10 mL of 1 mM HCl and analyzed as the sausage samples.

SDS-PAGE. Myofibrillar proteins were extracted by homogenization of 1 g of sausage in 5 mL of a solution containing 7 M urea, 2 M thiourea, and 400 mM Tris-base. The homogenate was centrifuged for 20 min at 10000g at 4 °C, and the supernatant containing myofibrillar proteins was separated. The protein concentration of the myofibrillar protein extracts were determined by using the Bradford assay.²³ The

protein concentration was adjusted with water to give a final concentration of 2 mg/mL and diluted 1:1 with SDS-PAGE sample buffer [2% SDS, 20% glycerol, 20 mM Tris-Cl, pH 6.8, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 160 mM dithiothreitol (DTT), and 0.1 mg/mL bromophenol blue] to give a final concentration of 1 mg/mL. The samples were heated at 100 °C for 5 min prior to electrophoresis. SDS-PAGE was carried out under reducing conditions,²⁴ using Criterion TGX (any kDa) precast ready-made gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The amount of protein solution injected into the electrophoresis gels was 20 μ L in each lane. After electrophoresis, the gels were covered with fixative solution (40% methanol, 10% acetic acid) and then stained using Coomassie Brilliant Blue R-250. The molecular weights of the products of proteolysis were estimated by reference to the relative motilities of standard proteins.

Statistical Analysis. Statistical analysis was carried out using Statgraphics, ver. 5.1. Plus. The analyses were conducted across the two manufactured batches (SMS and SMS+P) and six different ripening times (0, 1, 3, 5, 7, and 9 days), so 18 individual units per treatment were analyzed. Data are presented as mean and standard deviation (SD). One-way ANOVA was performed. Bartlett's test was used to test the null hypothesis that the standard deviations of data (within each of the model systems) were the same. Duncan's test for multiple mean comparisons procedure was used to determine which means are significantly different from others (at 95% of confidence level).

■ RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical Parameters. DM, pH, and a_w mean values and standard deviations for SMS and SMS+P are shown in Figure 1. The products showed significant differences ($P < 0.05$) for the three physicochemical parameters studied throughout all stages of the manufacturing process. As expected, results showed that the lowest DM content ($P < 0.05$) could be attributed to the samples collected on day 0 ($28.11 \pm 0.31\%$ for SMS and $27.16 \pm 0.30\%$ for SMS+P). As ripening progressed, a steady and considerable increase in DM was observed, and the highest value was reached at day 9 ($56.12 \pm 0.98\%$ for SMS and $51.66 \pm 0.62\%$ for SMS+P). There were also significant differences ($P < 0.05$) in pH, so the highest value was detected at day 0 (5.64 ± 0.04 for SMS and 5.84 ± 0.03 for SMS+P). Lactic acid production due to the fermentation of sugars by lactic acid bacteria led to the lowest pH values at day 3 (around 5.00). From day 5, a slight increase in pH was observed in both batches. This may be due to production of free amino acids and ammonia as a result of enzymatic activity.^{2,25} With the increase in DM, previously mentioned, a_w decreased constantly (from 0.960 ± 0.001 in SMS and 0.953 ± 0.001 in SMS+P to 0.911 ± 0.001 and 0.903 ± 0.001 , respectively), which results in a microbial stabilization of the transformed product. The measured parameters are within the normal range previously described for dry fermented sausages,^{26,27} taking into account that the products manufactured for this study had a shorter ripening time (9 days) compared to commercial brands (around 20–28 days), which explains that higher DM values have not been reached at the end of the process.

NMR Studies on Sausage Model Systems. *Water Mobility and Distribution throughout Sausage Model Manufacturing.* Distributed exponential analysis of the NMR T_2 relaxation data revealed the presence of three different water populations in SMS (Figure 2A): a minor component, with relaxation times around 1–10 ms (T_{2b}), a major component around 30–70 ms (T_{21}), and a slower relaxing component (T_{22}) around 100–300 ms. Chopping results in disintegration

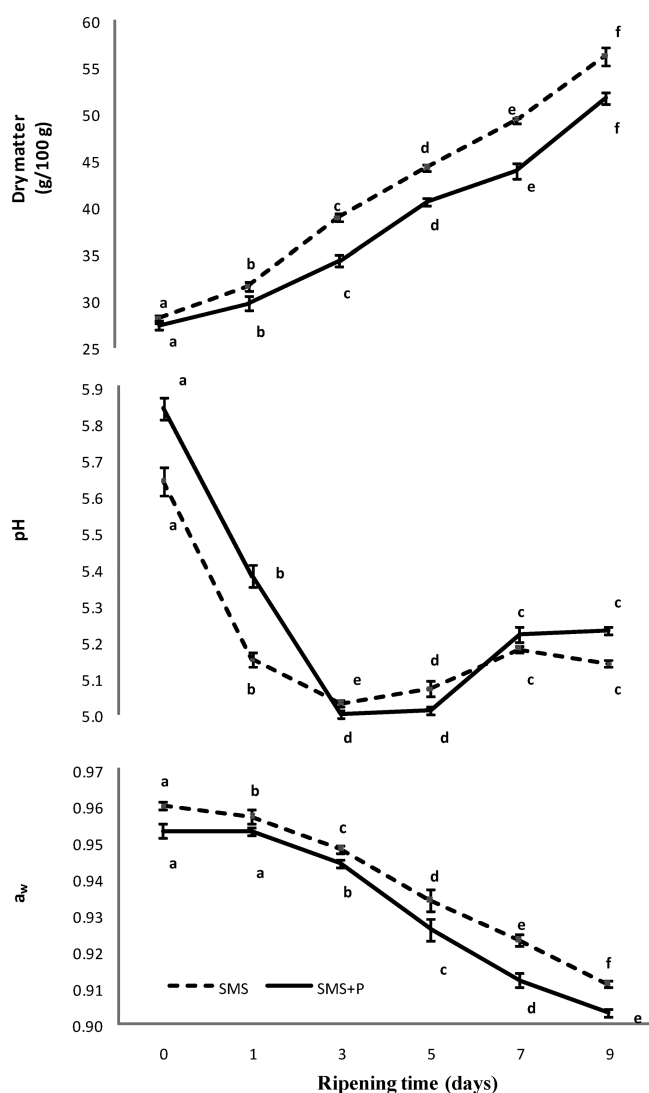


Figure 1. Physicochemical parameters obtained for sausage model systems (SMS) and models with protease (SMS+P) at different ripening times (mean value and standard deviation of six replicates). Values with different letters within the same line are statistically different ($P < 0.05$).

of the overall structure with maintenance of intact myofibrils. It has been previously proved¹² that disruption of the macroscopic structure of fresh meat did not change the relaxation pattern in meat, so water assignments for minced meat are comparable to those obtained in fresh meat. It has been suggested that T_{2b} represents water closely associated with macromolecules and/or protons in plasticized macromolecular structures; T_{21} reflects water located within highly organized protein structures, and T_{22} represents more mobile water located in extramyofibrillar spaces.^{12,28,29} The T_{22} population was not present at day 0, but it was detected on all of the consecutive ripening days analyzed, which suggests that it may be related to protein aggregation. Intensive chopping and a high concentration of NaCl result in the swelling of myofibrils and the dissolving process of proteins, so water is mainly associated with myofibrillar proteins. After a certain period of adaptation, the growth of lactic acid bacteria results in the formation of lactic acid,² and the pH decrease brings the myofibrillar proteins gradually closer to their isoelectric point and their water-binding capacity decreases.³⁰ Consequently, the

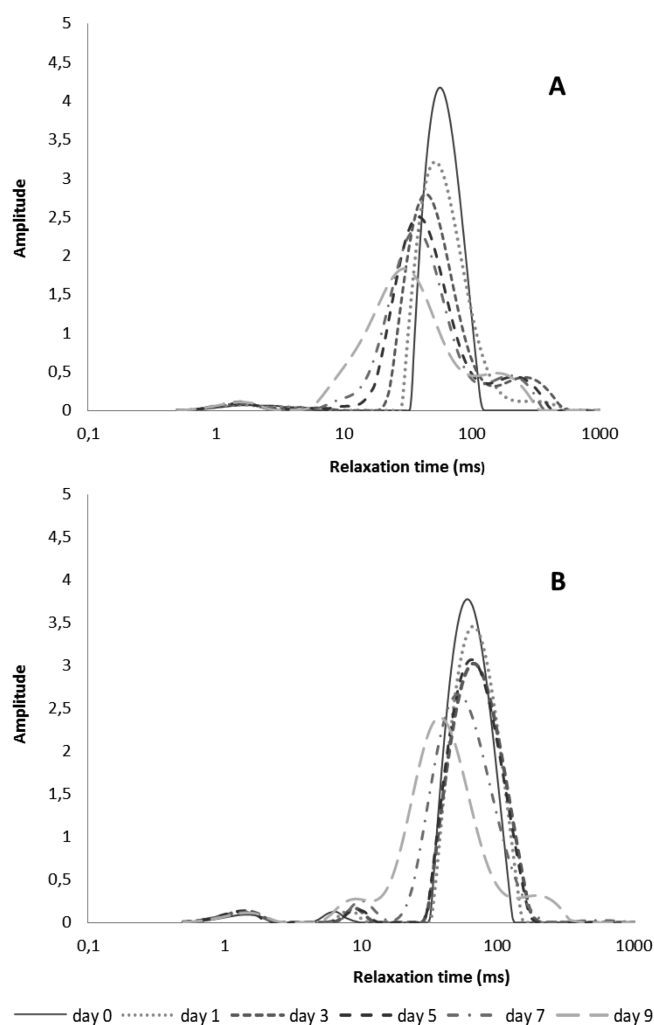


Figure 2. Distributed NMR T_2 relaxation times obtained on sausage models on days 0, 1, 3, 5, 7, and 9 after production: (A) sausage models systems (SMS); (B) sausage models with proteases (SMS+P). Each curve represents a mean of six measurements.

amount of immobilized water entrapped by myofibrillar proteins is reduced; meanwhile, protein chains are approaching each other, creating aggregates. Once inside the ripening cabinet, water release from the interior of the sausage takes place partially by diffusion, due to the moisture difference between the sausages and the environment,³¹ which leads to the appearance of the T_{22} population, related to this mobile extramyofibrillar water fraction. The drying process of meat resulted in a shift toward faster relaxation times for both populations, T_{21} and T_{22} . This shift may be explained, mainly, by the fact that the viscous protein system is transformed from the "sol-state" into the colloidal viscous "gel-state"³¹ that leads to the constitution of an irreversible protein network that holds water in a less mobile state.³² The existence of different water fractions and their changes during the drying process in sausage models found in the present work is in good agreement with data obtained in a previous study on fermented meat¹⁴ except for the absence of the T_{22} component at day 0. This difference could be due to the existence of a resting period at cooling temperature (4 °C, approximately) before stuffing into casings and the absence of starter added culture in the present work, which may have a significant effect on preserving protein structure from coagulation or aggregation, because, as

Table 1. Mean Relaxation Time and Relative Area for the T_2 Relaxation Populations T_{21} and T_{22} Obtained for Sausage Model Systems (SMS) and Models with Proteases (SMS+P) on Days 0, 1, 3, 5, 7, and 9 after Production^a

sample/ripening time (days)	T_{21}		T_{22}	
	relative area	relaxation time	relative area	relaxation time
SMS/0	96.3 ± 0.3 a, α	56.7 ± 0.9 a, β		
SMS/1	93.7 ± 0.3 b, β	52.4 ± 1.3 b, β	3.2 ± 0.4 c	228.9 ± 71.1 a
SMS/3	84.4 ± 0.5 c, β	44.4 ± 1.2 c, β	12.4 ± 0.5 a	260.5 ± 12.0 a
SMS/5	85.0 ± 0.9 c, β	38.3 ± 1.2 d, β	11.7 ± 0.7 b	215.8 ± 8.0 a
SMS/7	85.6 ± 0.6 c, β	37.1 ± 1.4 d, β	11.5 ± 0.3 b	202.7 ± 7.0 b
SMS/9	84.3 ± 0.7 c, β	30.0 ± 1.4 e, β	12.8 ± 0.2 a, α	149.1 ± 21.3 c, β
SMS+P/0	95.7 ± 0.2 a, β	60.4 ± 1.1 b, α		
SMS+P/1	94.8 ± 0.5 b, α	66.5 ± 1.1 a, α		
SMS+P/3	94.7 ± 0.3 b, α	67.3 ± 2.9 a, α		
SMS+P/5	94.5 ± 0.6 b, α	64.7 ± 2.5 a, α		
SMS+P/7	92.5 ± 1.2 c, α	51.8 ± 2.5 c, α		
SMS+P/9	89.5 ± 1.9 d, α	37.9 ± 2.1 d, α	7.8 ± 1.8 β	190.8 ± 40.5 α

^aMean values and standard deviation of six replicates. Values with different letters (a–d) in the same column for the same model system indicate significant differences ($P < 0.05$): differences between ripening times. Values with different letters (α , β) in the same column for the same ripening time indicate significant differences ($P < 0.05$): differences between batches.

mentioned above, the temperature and the pH descent are key factors in promoting the structural changes in the protein matrix.

Effect of Proteases on Sausage Models Structure.

Figure 2B shows distributed T_2 relaxation times obtained on SMS+P. T_{2b1} , T_{2b2} , and T_{21} populations were identified for all ripening times. Previous studies^{14,33} have related the addition of salt to the appearance of a T_{2b2} population (5–10 ms), absent in fresh meat, and also identified in this batch throughout the entire manufacturing process. The presence of this new population could be associated with a different distribution of salt in both batches. For the SMS batch, it was possible to distinguish the T_{2b2} component only on days 0, 1, and 3 of production, although it was not a clear peak and appeared almost merged with T_{2b1} . In this batch, ripening took place on a conventional basis, which means that the myofibrils were able to swell and retain water, and the added salt was easily absorbed or incorporated into protein structure as ripening progressed. The proteins dissolved as a result of the mincing and the addition of salt produce filament-shaped aggregates that interact and contribute to the stability of the gel.² However, in SMS+P models, protein breakdown prevented an efficient absorption of salt by myofibrils in such a way that it together with water constituted an independent compartment with faster relaxation time, different from the major myofibrillar protein component (T_{21}) that could be clearly identified during the entire process. The presence of the T_{2b2} population suggests that the protein matrix did not present a strong and well-organized structure. The T_{22} component was not present in SMS+P samples until day 9, which constitutes an important difference compared to T_2 distributions in SMS. The absence of the T_{22} component suggests a nonaggregation behavior of the proteins. Partial denaturation of protein is required as an initial step to achieve the ordered protein–protein interaction and aggregation;³⁴ however, the hydrolysis induced by proteases prevents the proper establishment of the protein network and severely affects final texture resulting in a softening of the product, as previously reported.^{4,5} Consequently, T_{2b2} and T_{22} populations are both related to the absence of a strong and firm protein matrix. Proteolysis can also produce an extensive unfolding of the protein inducing the formation of a network

with large cavities where the T_{22} can be related to the mobile water in the cavities. Distributed T_2 relaxation times in SMS+P compared to that obtained for SMS showed how the structural integrity was changed by the introduction of proteases. In fact, the ripening-induced shift of T_{21} and T_{22} populations in SMS+P is not as noticeable as it is in SMS, suggesting that water immobilization is not taking place until day 7, as affected by protein degradation.

Time constants and relative areas (corresponding to the proportion of protons represented by the specific T_2 population) of the two main components (T_{21} and T_{22}) for SMS and SMS+P are shown in Table 1. Significant differences were detected by comparison between T_{21} relaxation times corresponding to SMS and SMS+P throughout ripening time, so that SMS+P consistently maintained higher T_{21} values over time. These findings can be related to the fact that the water content was also higher in SMS+P than SMS for the same studied stage, ranging from 71.9 ± 0.3 to 43.9 ± 0.9 g of water/100 g of sample in SMS and from 72.8 ± 0.3 to 48.3 ± 0.6 g of water/100 g sample in SMS+P. The drying process resulted in a decrease of the relative areas of both populations, although the decrease was more progressive in SMS and values were higher in SMS+P, especially from day 3 on.

Proteolysis in Model Samples As Measured by Increase in Free Amino Groups. Proteolysis was quantified by assaying for protein breakdown products through determination of free amino terminals (N-terminal + lysine side chains, as well as other amines that may be present). Although the concentration of free amino groups increased for both batches over time (Figure 3), higher values were found for SMS+P (concentration varied from 657.83 ± 1.54 to 1487.09 ± 5.06 mg Leu equiv/DM at days 0 and 9, respectively) than for SMS (values from 290.35 ± 3.71 to 487.78 ± 0.93 mg Leu equiv/DM, respectively), showing that the proteolysis was more prominent in the protease-added batch, SMS+P. This finding is in agreement with previous works^{4,5} in which the nitrogen fractions achieved higher values in protease-added batches than those of the control. Significant differences were found over time for both batches regarding free amino group concentration, although the lower increase occurred toward the end of the process for SMS+P, during days 7 and 9 (5.5%),

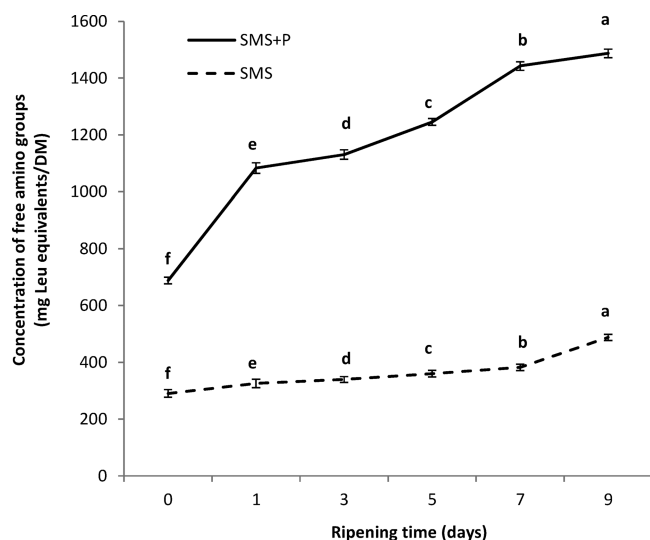


Figure 3. Concentration of free amino groups (mean values and standard deviation; expressed as mg leucine equiv/DM) quantified in SMS+P and SMS samples over time. Values with different letters within the same line are statistically different ($P < 0.05$).

suggesting a trend to stabilization, because the protease activity was higher between days 0 and 3 of production. During the fermentation and ripening of dry fermented sausages, a large number of biochemical reactions associated with the degradation of myofibrillar and sarcoplasmic proteins take place.^{4,5} These biochemical reactions are promoted by muscle endopeptidases (calpains I and II and cathepsins B, D, H, and L).³⁵ For batch SMS, therefore, the increase of free amino groups corresponds to a natural proteolysis process conducted by endogenous enzymes, so the protein degradation was lower during the whole process and, finally, the proteolysis rate increased during days 7 and 9, when the greatest increase in the concentration was found (53.5%). SMS+P samples experienced a substantial degradation from the moment of the addition of the enzymes (day 0), resulting in low-molecular-weight compounds. Meanwhile, SMS samples experienced a lower

extent of proteolysis, and it was possible to distinguish high-molecular-weight compounds, almost during the whole process. The considerably lower degree of protein degradation in SMS samples could explain why different free amino group concentrations were obtained. On the other hand, as proteolysis contributes to a weakening of the myofibrillar network and the subsequent generation of peptides and free amino acids that contribute to flavor development,³⁶ the formation of a large amount of free amino groups is inconsistent with the emergence of the T_{22} component, because this fact is opposed to the establishment of an organized and compact meat matrix. However, a moderate production of amino groups combined with appropriate dehydration conditions allow the development of a high structured meat gel in which T_2 distributed data could be characterized by the presence of the T_{22} population during almost the whole process.

SDS-PAGE. As the contribution from myofibrillar proteins is the most important parameter for the development of desirable gel characteristics in processed meat products,^{3,37} SDS-PAGE of myofibrillar proteins was performed to elucidate the differences in protein degradation pattern between SMS and SMS+P. Some bands were identified on the basis of their molecular weights, determined by comparison with standards in the stained gel (Figure 4). Heavy myosin chain (MHC) (220 kDa), α -actinin (94 kDa), actin (45 kDa), troponin-T (37 kDa), tropomyosin (35 kDa), myosin light chains (MLC) 1, 2, and 3 (25, 18, and 15 kDa, respectively), troponin I (24 kDa), and troponin C (20 kDa) were present in all SMS samples.³⁸ As ripening progressed, a degradation of myofibrillar proteins was evident. The intensity of MHC and actin bands decreased over time; troponin T and tropomyosin degradation was also noticeable. MLC 1 and troponin I bands were not so intense from day 3 on, and MLC 2 and 3 were especially affected by proteolysis because they disappeared completely after 3 days of ripening. New polypeptides of smaller size (≈ 12 kDa) also accumulated from day 1 on. These findings are in agreement with previous studies on fermented sausages,^{15,16,39} although in the present study the pattern of proteolysis was not that intense due to the fact that sausages were ripened for a shorter period

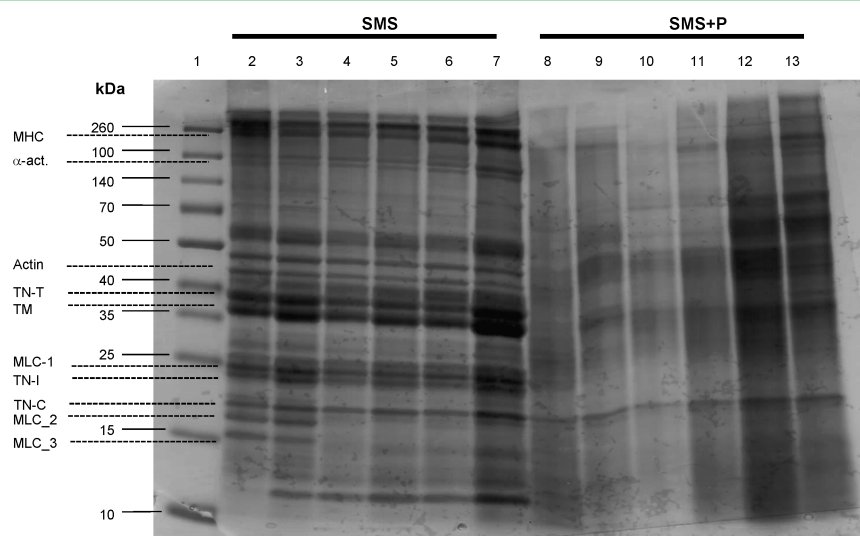


Figure 4. SDS-PAGE electrophoretograms of myofibrillar proteins throughout the ripening of sausages. Lanes: 1, protein standards; 2–7, sausage model systems (SMS), days 0, 1, 3, 5, 7, and 9; 8–13, models with proteases (SMS+P), days 0, 1, 3, 5, 7, and 9. MHC, heavy myosin chain; α -act., α -actinin; TN-T, troponin-T; TM, tropomyosin; MLC 1, 2, 3, myosin light chains 1, 2, and 3; TN-I, troponin I; TN-C, troponin C.

of time. Throughout fermentation, the combination of salt, temperature (20–26 °C), and the decline in pH provokes insolubilization of sarcoplasmic and myofibrillar proteins. Insolubilization progresses during ripening due to advanced dehydration.^{2,41} A decrease in the solubility of myofibrillar proteins was observed, because the bands were much more intensely stained at the end of ripening than at day 0. The loss in myofibrillar protein solubility has been previously described by other researchers.^{15,40} A dramatically different protein band pattern was observed for SMS+P, where high-molecular-weight compounds cannot be distinguished as a result of the proteolysis to which samples have been subjected. However, protein insolubilization during drying was clearly evident. These results, together with proteolysis measurements (Figure 3), prove that protein denaturation on SMS+P was very intense from day 0; consequently, the molecular weight of the protein chains is too low, and they solubilize completely before aggregating. The solubility of myofibrillar proteins in SMS+P decreased with ripening time due to the dehydration process and the increase in salt concentration, which leads to the aggregation of protein chains and the formation of higher molecular weight compounds, so the bands on days 7 and 9 were more intensely stained than on previous days. With regard to T_2 distributions, the stronger protein chain association at day 9 compared with earlier stages by reducing the pore size of the matrix due to the water loss, together with the extensive unfolding suffered by proteins, could be associated with the appearance of T_{22} population, suggesting that some degree of aggregation is needed for the presence of the water population T_{22} in dried sausages. The fact that the T_{2b2} population was also present in the final stages supports the hypothesis that a true coagulation is not taking place and the structural modification is not complete and, further, related to the dehydration taking place during ripening.

In conclusion, the present study revealed that (i) changes in water mobility and distribution during the manufacture of sausage model systems were detectable by means of LF-NMR relaxation, where ripening produced a shift toward faster relaxation times related to the reduction of the intrinsic pore size of the meat matrix; and (ii) the distribution of water in sausage models was significantly affected by the addition of proteases to the meat batter, supporting the role of myofibrillar proteins in meat coagulation and suggesting that some aggregation degree is needed for the presence of a T_{22} population in fermented sausages. Finally, the extinction of the T_{22} population in meat systems could be associated with a high enzymatic proteolysis degree and, consequently, the presence of great amounts of free amino groups.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(H.C.B.) Phone: +45 87 158 353. E-mail: HanneC.Bertram@food.au.dk.

Funding

The present work received financial support from Project AGL2010-19158 funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness – General Directorate of Scientific Research, and A.B.G.G. was awarded a grant (BES-2011-047485) from the same institution. H.C.B. acknowledges the Danish Research Council FTP for financial support through Project “Advances in food and nutrition research through implementation of metabolomics technologies (274-09-0107)”.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

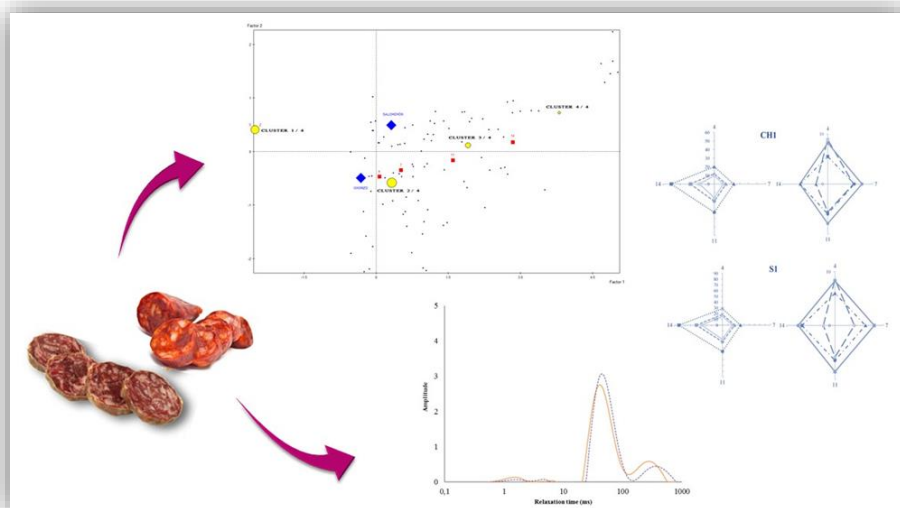
ACKNOWLEDGMENTS

We thank Hanne Søndergaard Møller, Department of Food Science, Aarhus University, for technical assistance.

REFERENCES

- (1) Trout, G. R. Techniques for measuring water-binding capacity in muscle foods – a review of methodology. *Meat Sci.* **1988**, *23*, 235–252.
- (2) Ordóñez, J. A.; Hierro, E. M.; Bruna, J. M.; Hoz, L. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Crit. Rev. Food Sci.* **1999**, *34*, 329–367.
- (3) Tornberg, E. Effects of heat on meat proteins-Implications on structure and quality of meat products. *Meat Sci.* **2005**, *70*, 493–508.
- (4) Díaz, O.; Fernández, M.; García de Fernando, D. G.; de la Hoz, L.; Ordóñez, J. A. Proteolysis in dry fermented sausages: the effect of selected exogenous proteases. *Meat Sci.* **1997**, *46*, 115–128.
- (5) Díaz, O.; Fernández, M.; García de Fernando, D. G.; De la Hoz, L.; Ordóñez, J. A. Effect of the addition of Pronase E on the proteolysis in dry fermented sausages. *Meat Sci.* **1993**, *34*, 205–216.
- (6) Fernández, M.; Ordóñez, J. A.; Bruna, J. M.; Herrans, B.; de la Hoz, L. Accelerated ripening of dry fermented sausages. *Food Sci. Technol.* **2000**, *11*, 201–209.
- (7) Capitani, D.; Mannina, L.; Proietti, N.; Sobolev, A. P.; Tomassini, A.; Micheli, A.; DiCocco, M. E.; Capuani, G.; DeSalvador, F. R.; Delfini, M. Metabolic profiling and outer pericarp water state in Zespri CIGI and Hayward Kiwifruits. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1727–1740.
- (8) Li, T.; Rui, S.; Li, W.; Chen, X. H.; Jiang, M.; Dong, M. S. Water distribution in tofu and application of T_2 relaxation measurements in determination of tofu's water holding capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 8594–8601.
- (9) Hager, A. S.; Bosmans, G. M.; Delcour, J. A. Physical and molecular changes during the storage of gluten-free rice and oat bread. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 5682–5689.
- (10) Greiff, K.; Fuentes, A.; Aursand, I. G.; Erikson, U.; Masot, R.; Alcaniz, M.; Barat, J. M. Innovative non-destructive measurements of water activity and the content of salts in low-salt hake minces. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2496–2505.
- (11) Bertram, H. C.; Dønstrup, S.; Karlsson, A. H.; Andersen, H. J. Continuous distribution analysis of T_2 relaxation in meat: An approach in the determination of water holding capacity. *Meat Sci.* **2001**, *60*, 279–285.
- (12) Bertram, H. C.; Karlsson, A. H.; Rasmussen, M.; Pedersen, O. D.; Andersen, H. J. Origin of multiexponential T_2 relaxation in muscle myowater. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3092–3100.
- (13) Bertram, H. C.; Andersen, H. J. Applications of NMR in meat science. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2004**, *53*, 158–202.
- (14) Møller, S.; Gunvig, A.; Bertram, H. C. Effect of starter culture and fermentation temperature on water mobility and distribution in fermented sausages and correlation to microbial safety studied by nuclear magnetic resonance relaxometry. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 462–467.
- (15) García de Fernando, D. G.; Fox, P. F. Study of proteolysis during the ripening of a dry fermented pork sausage. *Meat Sci.* **1991**, *30*, 367–383.
- (16) Hughes, M. C.; Kerry, J. P.; Arendt, E. K.; Kenneally, P. M.; McSweeney, P. L.; O'Neill, H. Characterization of proteolysis during the ripening of semi-dry fermented sausages. *Meat Sci.* **2002**, *62*, 205–2016.
- (17) Ohashi, K.; Negishi, H. Hydrolysis of pork myofibrillar proteins during fermentation using starter cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Food Sci. Technol. Res.* **2014**, *20*, 679–685.
- (18) *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 18th ed., 1st rev.; AOAC International: Gaithersburg, MD, USA, 2006.

- (19) Carr, H. Y.; Purcell, E. M. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Am. J. Physiol.* **1954**, *94*, 630–638.
- (20) Meiboom, S.; Gill, D. Modified spin-echo method for measuring nuclear times. *Rev. Sci. Instrum.* **1958**, *29*, 688–691.
- (21) Butler, J. P.; Reeds, J. A.; Dawson, S. V. Estimating solutions of 1st kind integral equations with nonnegative constraints and optimal smoothing. *SIAM J. Numer. Anal.* **1981**, *18*, 381–397.
- (22) Jansson, T.; Clausen, M. R.; Sundekilde, U.; Eggers, N.; Nyegaard, S.; Larsen, L.; Ray, C.; Sundgren, A.; Andersen, H. J.; Bertram, H. C. Lactose-hydrolyzed milk is more prone to chemical changes during storage than conventional UHT milk. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 7886–7896.
- (23) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (24) Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- (25) Lücke, F. K. Fermented sausages. In *Microbiology of Fermented Foods*; Wood, B. J. B., Ed.; Blackie Academic and Professional: New York, 1998; pp 441–483.
- (26) Ordóñez, J. A.; Hoz, L. Embutidos crudos curados. Tipos. Fenomenos madurativos. Alteraciones. In *Enciclopedia de la Carne y los Productos Cárnicos*; Martín and Macías: Cáceres, Spain, 2001; Vol. II, pp 1063–1090.
- (27) Herrero, A. M.; Ordóñez, J. A.; Romero de Ávila, M. D.; Herranz, B.; de la Hoz, L.; Cambero, M. I. Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Sci.* **2007**, *77*, 331–338.
- (28) Bertram, H. C.; Purslow, P. P.; Andersen, H. J. Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: a low-field nuclear magnetic resonance study. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 824–829.
- (29) Venturi, L.; Rocculi, P.; Cavani, C.; Placucci, G.; Rosa, M. D.; Cremonini, M. A. Water absorption of freeze-dried meat at different water activities: a multianalytical approach using sorption isotherm, differential scanning calorimetry, and nuclear magnetic resonance. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 10572–10578.
- (30) Albarracín, W.; Sánchez, I. C.; Grau, R.; Barat, J. M. Salt in food processing; usage and reduction: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *46*, 1329–1336.
- (31) Katsaras, K. Microstructure of fermented sausage. *Meat Sci.* **1992**, *31*, 121–134.
- (32) Sun, X. D.; Holley, R. A. Factors influencing gel formation by myofibrillar proteins in muscle foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2010**, *10*, 33–51.
- (33) Andersen, R. H.; Andersen, H. J.; Bertram, H. C. Curing-induced water mobility and distribution within intra- and extra-myofibrillar spaces of three pork qualities. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2007**, *42*, 1059–1066.
- (34) Barbut, S. Importance of fat emulsification and protein matrix characteristics in meat batter stability. *J. Muscle Foods* **1995**, *6*, 161–177.
- (35) Toldrá, F. Biochemical proteolysis basis for improved processing of dry-cured meats. In *Advanced Technologies for Meat Processing*; Nollet, L. M. L., Toldrá, F., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2006; pp 329–354.
- (36) Toldrá, F. The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *17*, 164–168.
- (37) Andersson, K.; Andersson, A.; Tornberg, E. Microstructure as related to the water-holding, textural and sensory properties of emulsion sausages. In *Food Colloids – Proteins, Lipids and Polysaccharides*; Dickinson, D., Bergenstahl, B., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 1997; pp 29–42.
- (38) Porcio, M. A.; Pearson, A. M. Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *490*, 27–34.
- (39) Roseiro, L. C.; Santos, C.; Sol, M.; Borges, M. J.; Anjos, M.; Gonçalves, H.; Carvalho, A. S. Proteolysis in Painho de Portalegre dry fermented sausage in relation to ripening time and salt content. *Meat Sci.* **2008**, *79*, 784–794.
- (40) Astiasarán, I.; Villanueva, R.; Bello, J. Analysis of proteolysis and protein insolubility during the manufacture of some varieties of dry sausage. *Meat Sci.* **1990**, *28*, 111–117.
- (41) Wardlaw, F. B.; Skelley, G. C.; Johnson, M. G.; Acton, J. C. Changes in meat components during fermentation, heat processing and drying of a summer sausage. *J. Food Sci.* **1973**, *38*, 1228–1231.



Trabajo 4

Distribución y movilidad de agua durante el proceso de elaboración de embutidos crudos curados y su relación con características fisicoquímicas y reológicas

Publicado en *European Food Research and Technology*, 243 (2017), 455-466

Continuando con la línea de investigación iniciada con los modelos cárnicos, en el **Trabajo 4** se planteó utilizar la relaxometría T_2 para realizar el estudio microestructural de embutidos crudos curados, recreando las condiciones típicas de un proceso de elaboración tradicional durante un total de 14 días. Se elaboraron embutidos tipo chorizo y tipo salchichón con distintos niveles de grasa y se analizaron a distintos tiempos de maduración. También en este caso, se obtuvieron distintas poblaciones (T_{2b} , T_{21} , T_{22}) de protones, que experimentaron una evolución durante el curado similar a la observada previamente en los modelos cárnicos sin proteasas. El avance de la maduración estuvo marcado por la fermentación microbiana de la masa cárnica, que indujo cambios en la matriz proteica debido al descenso de pH y que se han relacionado con la aparición de la población T_{22} , y la deshidratación, que marcó la reducción de los tiempos de relajación durante todo el proceso. El comportamiento de ambos tipos de productos fue similar, sugiriendo que experimentaron una maduración paralela. Se realizó además un análisis de perfil de textura (TPA) en los tiempos de análisis para evaluar la evolución estructural mediante un método tradicional. El análisis multivariante mediante análisis de clusters reveló una clara discriminación entre muestras según su tiempo de maduración y el coeficiente de correlación de Pearson se utilizó para establecer el grado de dependencia lineal entre T_2 -parámetros fisicoquímicos y T_2 -características de textura. En este sentido, la población mayoritaria T_{21} mostró un grado de dependencia más fuerte, especialmente con el contenido en agua ($r=0,93$) y la dureza ($r=0,87$), mientras que las otras poblaciones, T_{2b} y T_{22} , mostraron un grado de asociación mucho más débil con los parámetros fisicoquímicos y de textura.

Este estudio demuestra que la relaxometría T_2 es una técnica prometedora para establecer relaciones entre los estados biofísicos del agua intrínseca de la matriz cárnica y la evolución de las propiedades texturales de los embutidos crudos curados.

Como futura línea de investigación, sería interesante plantear un estudio de RMN centrado en la grasa, puesto que, en este caso, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de grasa empleados y sería muy relevante plantear un nuevo diseño para elucidar este punto.

Water mobility and distribution during dry-fermented sausages “Spanish type” manufacturing and its relationship with physicochemical and textural properties: a low-field NMR study

Ana Belén García García¹ · M^a Isabel Cambero Rodríguez¹ ·
M^a Dolores Romero de Ávila Hidalgo¹ · Hanne Christine Bertram²

Received: 18 April 2016 / Revised: 16 June 2016 / Accepted: 16 July 2016 / Published online: 6 August 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Changes in the mobility and distribution of water in dry-fermented sausages Spanish type (“chorizo” and “salchichón”, 20 and 40 % fat) throughout ripening were detected by NMR T_2 relaxation. Three to four different water populations (T_{2b1} , T_{2b2} , T_{21} and T_{22}) were detected. Multivariate cluster analysis revealed a clear discrimination between samples of different ripening times, and significant differences were found in the physicochemical parameters, T_2 relaxation data and textural properties of sausages according to the production day (0, 2, 4, 7, 11 and 14). Pearson product-moment correlation coefficient (PCC) was used to establish the degree of linear dependence between T_2 relaxation–physicochemical characteristics and T_2 relaxation–textural properties. A strong correlation was found between the main component T_{21} and the water content ($r = 0.93$), T_{21} and a_w ($r = 0.87$), as well as between T_{21} and hardness ($r = -0.78$), although the other two water populations, mainly T_{2b} , showed a lower degree of association with the physicochemical and textural parameters. Consequently, the study demonstrated that LF-NMR relaxometry is a promising technique to elucidate associations between the biophysical state of intrinsic water and progression in textural properties of dry-fermented meat products.

Keywords Fermented sausages · Ripening · NMR relaxation · Physicochemical features · Textural properties

Introduction

A large variety of dry-cured meat products are produced and consumed in Spain. Dry-fermented sausages, in particular, are considered traditional products with a high gastronomic value for consumers worldwide. Dry-fermented sausages consist of a mixture of meat and fat particles, salt, curing agents, spices and condiments, which have been stuffed into casings, fermented and dried [1]. Fermentation refers to the breakdown of carbohydrates present in the meat batter, mainly to lactic acid, due to the action of lactic acid bacteria (LAB), which results in a pH decrease at this stage [2]. The ongoing acidification favors color formation and muscle protein coagulation, increasing firmness and cohesiveness of the product [3]. In the final ripening/drying phase, sausages are further dried, and the final texture and flavor of the product are developed as a result of different biochemical reactions affecting macromolecules (proteolysis, lipolysis and lipid oxidation) during this period [4]. Given the nonhomogeneous nature of meat sausages, the study of how water is distributed within the product offers both theoretical and practical interest, since the structural properties and the final quality of the sausages are determined by the type of interaction water may have with solutes present in the product, mainly water binding with proteins, since meat proteins represent the main functional ingredient in meat products. Different studies have been previously conducted in order to study distribution and mobility of water in meat systems by means of nuclear magnetic resonance (NMR) T_2 relaxation. Proton relaxation is governed by molecular movement and interaction

✉ Hanne Christine Bertram
HanneC.Bertram@food.au.dk

¹ Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

² Department of Food Science, Aarhus University, Research Centre Aarslev, Kirstinebjergvej 10, 5792 Årslev, Denmark

between nuclei, and T_2 relaxation provides valuable information about the nuclei environment [5]. It has been previously proved [6] that NMR relaxometry is a useful technique to study the drying process and to elucidate microbial safety in fermented meat products. A recent study [7] has been also conducted in order to establish the influence of lipid type in water and fat distribution in these meat derivatives. Moreover, our group has recently conducted a T_2 relaxometry study to elucidate structural changes in the protein matrix according to the ripening time and the addition of proteases in fermented sausage model systems [8]. Nevertheless, knowledge about water properties in fermented sausages is still only partially explored, despite the fact that this type of meat product is one of the most valuable and consumed meat-based product around the world. In addition, given the importance of texture in the final product, and taking into account the effect of fermentation and drying process on meat structure, it is interesting to evaluate the changes in textural parameters throughout the manufacturing process, since it may contribute to understand the effect of processing on products, probe the system structure and reveal critical aspects of food texture [9]. Texture profile analysis (TPA) is the most commonly used instrumental method to study texture of foods nowadays, and it has been previously used by different authors to study sausages [10–17]. However, TPA parameters have not been related to T_2 relaxation data, so far. Additionally, since texture is a sensory property which derives from the structure of the product (molecular, microscopic and macroscopic) it can be related to the relaxometry data, since T_2 provides valuable information about food structure [5]. Consequently, the aim of this study was to investigate the potential of low-field NMR relaxometry for elucidating changes in water mobility and distribution during the manufacturing process of dry-fermented sausages “Spanish type,” relating these results to those obtained from compression texture analysis (TPA) and physicochemical features in order to obtain a better understanding of the relation between the biophysical state of intrinsic water and product texture characteristics.

Materials and methods

Production of dry-fermented sausages “Spanish type”

Two different dry-fermented sausages “Spanish type” were produced: “salchichón” (S) and “chorizo” (CH). The different products were manufactured using a basis of pork meat, 150 ppm NaNO_2 , 150 ppm NaNO_3 and two different levels of fat (20 and 40 % w/w). Four different batches were produced: S1, CH1 (20 % fat) and S2, CH2 (40 % fat). The following ingredients were added to this basis in order to

get a product “salchichón type” (g or ml/Kg of product): sodium chloride (24), lactose (30), dextrose (5), black pepper (2.5) and water (10). For “chorizo type,” sodium chloride (24), dextrose (7), paprika pepper (12), garlic (4), oregano (2) and water (10) were added. Sausages were ripened for 14 days, and the process was conducted using the conditions previously described by García-García [8] (Fig. 1). Sampling was carried out at different times: days 0 (24 h after batter meat preparation and just before stuffing into casings), 2, 4, 7, 11 and 14. Eighteen independent units were manufactured for each batch (72 units were analyzed in total, considering the four mentioned batches). Three different sausages were collected of each product and manufacturing time. Physicochemical and texture analyses were immediately performed, and then units were vacuum-packaged and stored at -20°C until NMR analyses.

Physicochemical analysis

The water activity (a_w) measurements were carried out at 25°C using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA). The dry matter (DM) of the samples was determined by drying the sample at 110°C to constant weight, and the results were expressed as a percentage [18]. The pH was determined in a homogenate of the sample with distilled water (1:10) (w/v), using a Crison Digit-501 pH meter (Crison Instruments LTD, Barcelona, Spain). Six physicochemical measurements were performed per batch and ripening time. To estimate these parameters, two different portions of sample (2-cm thickness slices) were removed from the inner central part of the sausage units, and analyses were performed in triplicate per slice.

NMR analysis

Proton NMR relaxometry data were recorded on a Maran Benchtop Pulsed NMR Analyzer (Resonance Instruments, Witney, UK) operating at 23.2 MHz and equipped with an 18-mm variable temperature probe. Transverse relaxation time, T_2 , was measured using the Carr–Purcell–Meiboom–Gill sequence [19, 20]. The T_2 measurements were performed with a τ -value of 150 μs (time between 90° and 180° pulse), and data were acquired as 16 scan repetitions. The repetition time between two succeeding scans was 2 s. The obtained T_2 data were analyzed using distributed exponential fitting analysis according to the regularization algorithm by Butler [21] and carried out in MATLAB (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA) version 6.5 using in-house scripts. Sausage units were thawed prior to NMR analysis at room temperature for approximately 6 h. Six replicates (approx. 4 cm long, 1 cm in diameter) of each product and ripening time were analyzed at 25°C .

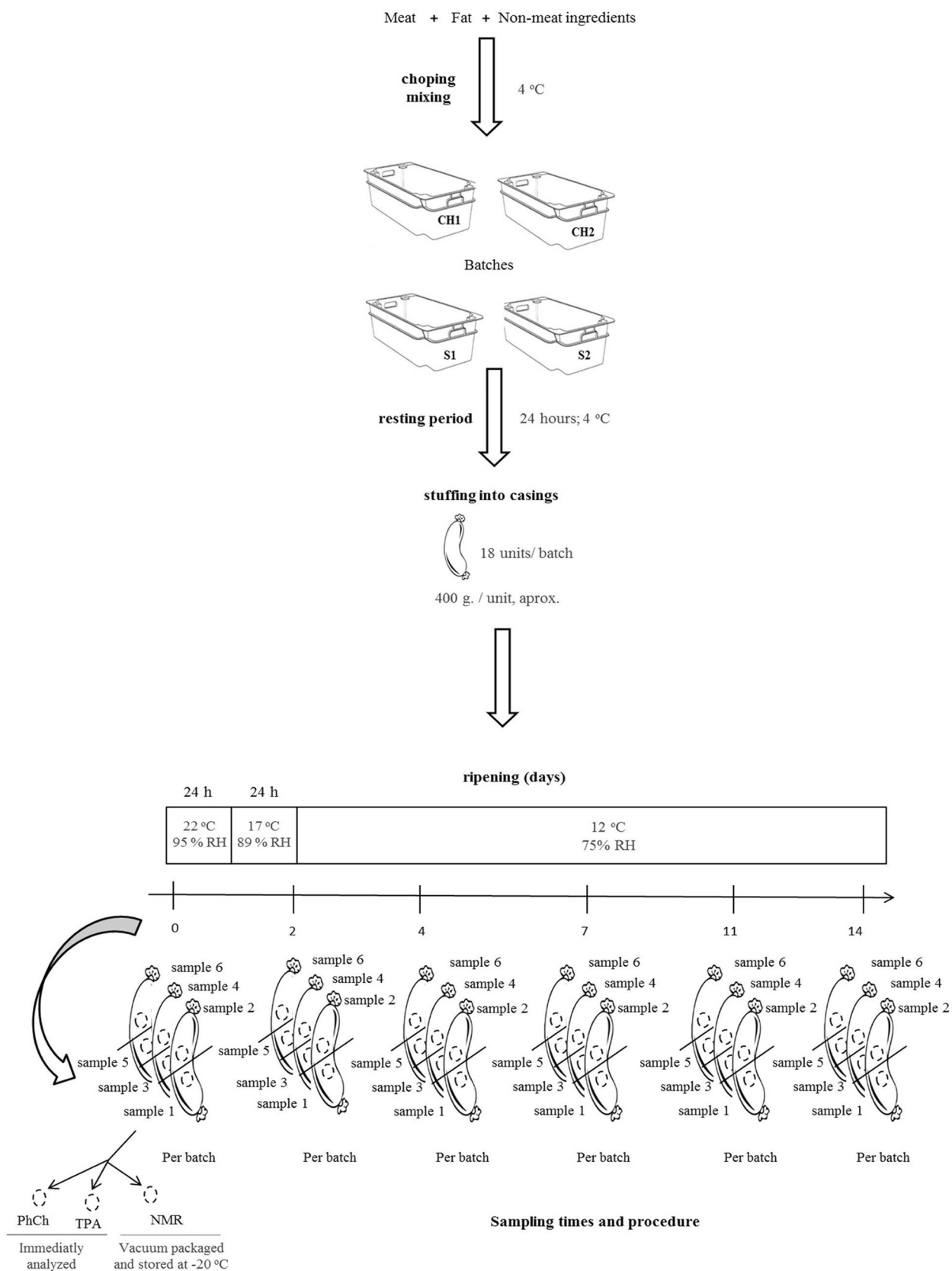


Fig. 1 Dry-fermented sausages production and sampling procedure. S1: Salchichón (20 % fat), CH1: Chorizo (20 % fat); S2: Salchichón (40 % fat); CH2: Chorizo (40 % fat); PhCh: physicochemical analysis; TPA: texture profile analysis; NMR: nuclear magnetic resonance analysis

Texture analysis

Texture profile analysis (TPA) [22] was carried out to determine mechanical behavior during the ripening process. TPA was performed using a TA.XT2i Texture Analyzer (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the Texture Exponent 32, 6.0.7.0. Version. Six sample cores (diameter = 2.5 cm, height = 1.0 cm) were obtained from the inner part of each of the studied products and ripening time. A double compression cycle test was performed of up to 50 % compression of the original height with an aluminum cylinder probe P/25. Force–time deformation curves were obtained with a 5-kg load cell applied at a crosshead speed of 1.0 mm/s. Measurements of samples were carried out at room temperature (25 °C).

Data analysis

To check the normal distribution (90 % confidence) of data, the Shapiro–Wilk test was applied. For the analysis of physicochemical, T_2 relaxation and textural data, a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, and Duncan's test for multiple mean comparisons procedure was used to determine which means were significantly different (at 95 % of confidence level). For this purpose, Statgraphics, version 5.1. Plus was used.

The whole data (physicochemical, T_2 relaxation and textural information obtained for CH1, CH2, S1 and S2 throughout ripening) were subjected to multivariate cluster analysis, performed with the methodology of the programme SPADSPAD.N, (2003) ("*Système Portable pour l'analyse des données*," View 5.6 CISIA Montreuil Cedex. France), to emphasize variation and bring out strong patterns in the dataset, so data became easy to explore and visualize. A combined strategy of classification algorithms was applied. In the first stage, type k -means iterative optimization techniques were applied, so that very homogeneous groups are identified, although in large number. In a second stage, a hierarchical agglomeration was applied, which allows determining the appropriate number of classes. The aggregation process is represented in a hierarchical tree, together with a histogram of the levels of aggregation in each step. Each cut made in the tree gives rise to a partition or typology. The most suitable cutting is deduced by observation and analysis of jumps or steps in the histogram of aggregation rates. Classes are characterized by those variables that present values above or below the global average. T value, statistical comparison of both mean values, was used to establish the level of significance and to sort the variables by their importance in the characterization of the classes obtained. The association was carried out taking into account the textural features (hardness, adhesiveness, springiness, cohesiveness, gumminess and chewiness).

In order to measure the degree of linear dependence between two variables, Pearson product-moment correlation coefficient (PCC) was applied on the obtained data to establish the dependence between T_2 relaxation—physicochemical characteristics and T_2 relaxation—textural properties.

Results and discussion

Changes during the ripening process

Physicochemical parameters

Dry matter (DM), pH and water activity (a_w) mean values and standard deviation for "chorizo" and "salchichón" are shown in Fig. 2. Using CH2 and S2 as examples (fat content close to commercial brands), the lowest DM content ($P < 0.05$) was obtained for day 0 samples (27.5 ± 0.3 % for CH2 and 27.6 ± 0.6 % for S2). As expected, these samples also showed the highest a_w (0.961 ± 0.001 and 0.958 ± 0.000 , respectively). DM experienced a progressive increment throughout ripening, and the highest value was reached at day 14, 58.4 ± 0.5 % for CH2 and 60.0 ± 1.2 % for S2, meanwhile a_w decreased constantly, until 0.888 ± 0.002 and 0.897 ± 0.002 , respectively. The highest pH value was obtained for day 0 (5.65 ± 0.03 for CH2 and 5.71 ± 0.01 for S2), and the lowest pH was reached for days 4–7 (around 5.00), due to the action of the microbiota naturally present in the meat batter. The same trend was observed for batches CH1 and S1. The experimental conditions under which this study was conducted (14 days of production) could explain slight differences found between these results and data obtained in previous works [17, 23–25], mainly regarding DM and a_w which usually reach higher and lower values, respectively, in finished commercial products with longer ripening times. Moreover, the development of a natural fermentation could be related to slight variations in pH, since it is known that there is an effect of starter culture on acidification, which also affects protein denaturation during processing [26]. In general, the final quality of fermented sausages is highly affected by fermentation stage and the starter cultures used [27–29]. The results obtained in the present study correspond to a natural fermentation process, where LAB experience a fast growth, due to curing agents, sugars addition, nitrates, a_w reduction and low oxygen tension [4], and LAB thereby ensure a pH decrease via glycolysis.

NMR relaxometry

Distributed T_2 relaxation data obtained on Spanish sausages "chorizo" and "salchichón" type during

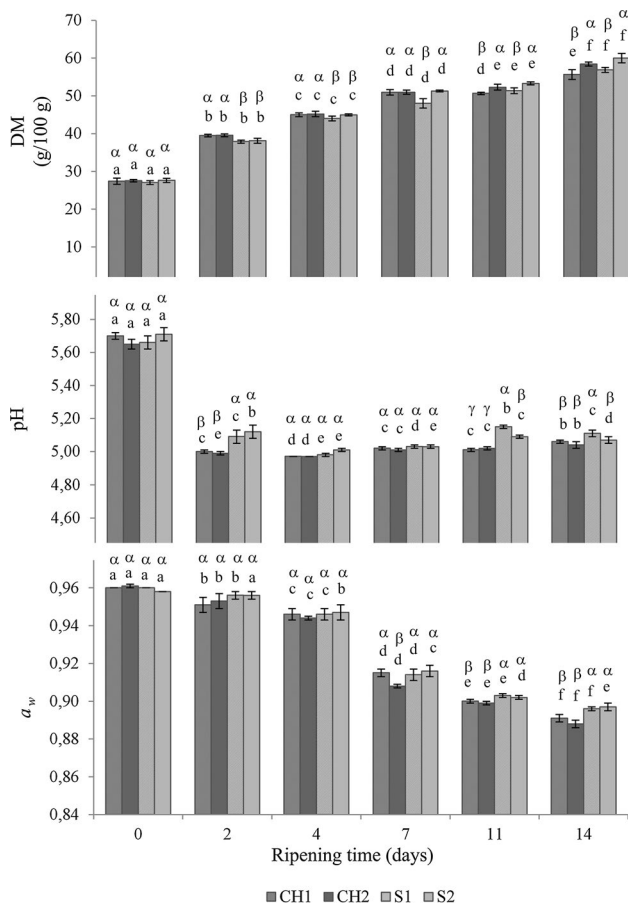


Fig. 2 Changes in physicochemical parameters (mean values and standard deviation) observed in dry-fermented sausages (CH1, CH2, S1, S2) during ripening. *a, b, c, d, e, f*: bars with different letters for the same sausage type are statistically different ($P < 0.05$); differences throughout ripening are shown α, β, γ : bars with different letters within the same ripening time are statistically different ($P < 0.05$); differences among product type are shown

manufacturing revealed the existence of three to four different populations of water (Fig. 3): two minor components, with relaxation times around 1–5 ms (T_{2b1}) and 5–10 ms (T_{2b2}), respectively, a major component characterized by relaxation times in the region around 20–60 ms (T_{21}) and finally a slower relaxing component (T_{22}) with a relaxation time around 100–400 ms. It has been suggested that the fastest populations with relaxation times between 1–10 ms represent water closely associated to macromolecules; T_{2b2} , in particular, has been related to the addition of salt to the meat batter [6, 8, 30]. T_{21} reflects water located within highly organized protein structures, and T_{22} represents mobile, extramyofibrillar water [31–34]. Water mobility and distribution were strongly affected by the ripening time, and a shift toward shorter relaxation times was observed due to the reduction of the pore size of the protein matrix induced by the drying process. As previously described by García-García [8], the T_{22} population

was not present in the sausage batters at day 0, since some extent of protein aggregation degree is required for the presence of this population in sausage samples. Consequently, at day 2, T_{22} became visible due to the pH descent and the onset of water loss as a result of the drying process. Moreover, T_{2b2} population was only clearly observed on days 0 and 2 of production, while from day 4 on, this component was indistinguishable, and the existence of one single water fraction within 1–10 ms region is shown, mainly in days 11 and 14, related to the absorption of the added salt into the protein structure and the consolidation of a firm, organized structure as the ripening process progressed. The same trend was obtained for the two other products studied and levels of fat (distributions not shown). T_2 relaxation time constants and corresponding areas of the two main components (T_{21} and T_{22}) for CH2 and S2 (closer to commercial brands) are shown in Table 1. Mean values of relative area for both T_{21} and T_{22} populations decreased significantly over time in all the products studied and, similarly, the mean relaxation time varied for both components, although they were remained longer throughout the entire ripening process in S2. The shift of the T_{21} and T_{22} populations toward faster relaxation indicates a higher degree of immobilization of water, and the change is related to the increase in the consistency of the meat matrix. While storage temperature of samples has proven to have a great impact on the degree of water binding by the myofibrillar protein system [35, 36], in the current study, the results strongly indicate that the freezing-thawing did not have any major impact on the time evolution and the relationship between water distribution and texture. Fat is, together with proteins, an important component in meat sausages. The small fat globules produced as a result of chopping are stabilized by a membrane coating mainly formed by salt-soluble myofibrillar proteins [37]. In the present study, no significant differences ($P < 0.05$) in T_2 distributions were found by comparison of the two levels of fat, suggesting that the amount of fat added did not affect water compartmentalization. This finding deviates from the results reported by Møller [6], since significant differences in relative areas and relaxation times depending on the level of fat (10, 25 and 40 %) were found. This discrepancy may be due to differences in the processing of products in the two studies, since fine cut emulsion-type sausages and dry-fermented sausages “Spanish type” present differences in their final structure and characteristics. Other authors [38] have also described in meat batters a shift of T_{22} component to longer relaxation times with the addition of fat. Nevertheless, it could be concluded that further investigations exploring the effect of fat amount on T_2 decay should be conducted in order to elucidate the importance of fat affecting the gelation properties of cured and dry-fermented products.

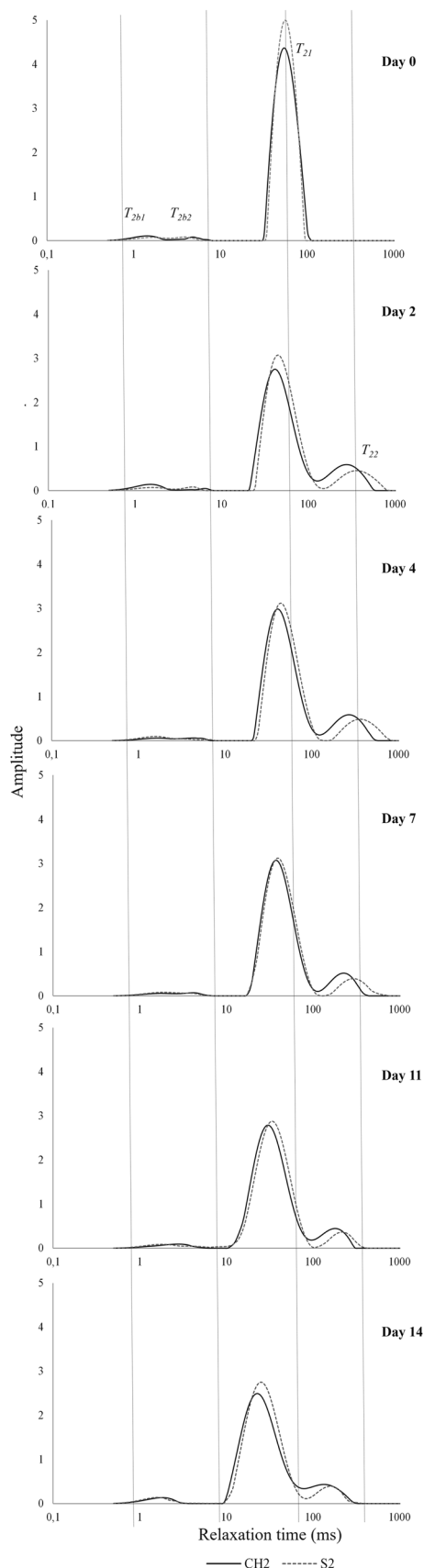


Fig. 3 Distributed T_2 relaxation times obtained on dry-fermented sausages, batch CH2, at days 0, 2, 4, 7, 11 and 14 after production. Each curve is a mean of six measurements

Textural properties

The most important changes on instrumental texture parameters were detected on day 4 for all products, when the initial meat mixture has been converted into a semisolid product with a higher consistency due to the loss of solubility of sarcoplasmic and myofibrillar proteins [39], making the effect of the drying process on instrumental texture parameters noticeable. Nevertheless, it should be noted that the mechanical behavior of samples from days 0 and 2 of production was difficult to measure given their nature and the characteristics of the equipment, and the values of the textural parameters for these samples were close to the detection limits. As expected, hardness tended to increase with time in all sausages. Similarly, chewiness (product of hardness \times cohesiveness \times springiness) and gumminess (product of hardness \times cohesiveness) varied over time as they are secondary textural characteristics. These textural parameters reached the highest values at day 14 of ripening. On the contrary, adhesiveness decreased with time, which is consistent with the formation of a firmer meat matrix that leads to a less sticky product. Springiness hardly changed throughout ripening, instead remaining quite stable over time. A slight increase in cohesiveness was also observed, according to a higher consistency of the sausages matrix, even though changes in cohesiveness during the studied stages were found to be nonsignificant ($P < 0.05$) for S2 samples. This finding could be due to the fact that the point that marks the decisive change in the texture of the sausages is fermentation, where the pH declines and the solubilized myofibrillar proteins start to aggregate to form a gel [15]. From day 4 on, the ordered protein network is already formed, and it does not experience additional drastic changes throughout the following 10 days of ripening. Even though the evolution of the texture profile for the two types of products studied (CH and S) changed similarly, the hardness and secondary texture parameters remained higher for S samples throughout ripening, regardless of the fat level. Consequently, at the end of production, the maximum values for hardness in day 14 were 50.4 N (CH1), 36.6 N (CH2), 81.4 N (S1) and 56.7 N (S2), respectively.

Contrary to observations for T_2 relaxation data, textural properties were highly affected by the fat content, since hardness was significantly ($P < 0.05$) higher in 20 % fat products; the same being the case for gumminess and chewiness, while adhesiveness was lower in CH1 and S1, mainly notable at the end of ripening (Fig. 4).

Table 1 Mean values and standard deviation of relaxation time and relative area for T_{21} and T_{22} populations obtained on batches CH2 and S2 on days 0, 2, 4, 7, 11 and 14 after production

Time (days)	CH1				S1				CH2				S2			
	Relative area		Relaxation time		Relative area		Relaxation time		Relative area		Relaxation time		Relative area		Relaxation time	
	T_{21}	T_{22}	T_{21}	T_{22}	T_{21}	T_{22}	T_{21}	T_{22}	T_{21}	T_{22}	T_{21}	T_{22}	T_{21}	T_{22}	T_{21}	T_{22}
0	95.2 ± 0.4 a, α	54.8 ± 1.7 a, α	–	–	95.7 ± 0.4 a, α	56.0 ± 0.9 a, α	–	–	95.5 ± 0.8 a, α	54.8 ± 0.8 a, α	–	–	96.1 ± 0.6 a, α	56.7 ± 0.9 a, α	–	–
2	77.3 ± 0.7 e, β	41.0 ± 0.5 b, β	18.7 ± 0.9 a, α	276.3 ± 7.4 a, β	82.4 ± 1.1 d, α	43.7 ± 0.6 b, α	14.0 ± 1.1 a, β	332.0 ± 24.3 b, α	78.0 ± 0.6 d, β	41.3 ± 0.7 b, β	17.7 ± 0.6 a, α	277.1 ± 6.5 a, β	83.0 ± 1.1 d, α	44.9 ± 0.6 b, α	13.8 ± 1.1 a, β	355.8 ± 6.1 a, α
4	81.0 ± 1.4 c, α	39.4 ± 1.1 c, β	15.3 ± 2.4 b, α	263.3 ± 9.9 a, β	82.2 ± 0.8 d, α	43.6 ± 0.9 c, α	14.1 ± 0.7 a, α	359.9 ± 8.5 b, α	81.1 ± 1.5 c, α	40.6 ± 0.5 c, β	15.9 ± 1.3 b, α	269.6 ± 13.8 a, β	82.7 ± 0.9 d, α	44.4 ± 0.8 b, α	13.8 ± 0.6 a, α	362.1 ± 14.1 a, α
7	85.4 ± 1.5 b, α	37.6 ± 1.1 d, α	11.0 ± 0.3 c, α	224.5 ± 6.2 b, β	87.4 ± 1.9 c, α	39.9 ± 1.0 d, α	8.9 ± 1.6 b, β	302.8 ± 26.2 c, α	85.3 ± 1.2 b, α	37.3 ± 1.7 d, α	11.8 ± 1.0 d, α	226.4 ± 17.1 b, β	87.2 ± 1.2 b, α	39.3 ± 2.8 c, α	9.4 ± 1.2 b, β	296.7 ± 34.0 b, α
11	85.0 ± 1.4 b, β	33.0 ± 2.8 e, α	10.2 ± 1.1 c, α	196.9 ± 20.2 c, α	89.4 ± 0.5 b, α	31.2 ± 2.5 e, α	6.7 ± 0.4 c, β	189.5 ± 19.9 d, α	86.1 ± 1.3 b, β	29.9 ± 2.2 e, α	10.7 ± 0.9 e, α	177.2 ± 32.0 c, α	88.7 ± 1.0 b, α	33.5 ± 1.7 d, α	7.6 ± 0.7 c, α	219.1 ± 20.5 c, α
14	81.6 ± 1.8 c, β	23.9 ± 1.3 f, α	14.7 ± 1.4 b, α	139.8 ± 12.8 d, β	86.9 ± 1.1 c, α	25.0 ± 2.8 f, α	8.6 ± 0.9 b, β	151.5 ± 15.2 e, α	82.8 ± 1.0 c, β	22.9 ± 1.5 f, α	13.5 ± 0.7 c, α	132.2 ± 13.3 d, β	86.6 ± 0.7 c, α	23.5 ± 1.2 f, α	9.4 ± 0.5 b, β	153.2 ± 5.1 d, α

a, b, c, d, e, f: Values with different letters within a column are statistically different ($P < 0.05$). Effect of ripening time is shownα, β: Values with different letters within a row are statistically different ($P < 0.05$). Effect of product type is shown

Cluster analysis

Multivariate cluster analysis is a useful tool to classify a set of individuals into homogeneous groups. Sausage samples were associated in four different clusters, using the textural features as association criteria (Fig. 5). The effect of ripening time is observed along Factor 1, while Factor 2 seems to group samples according to the sausage type (CH and S). The centroid method was the procedure used for computing the distance between two clusters. In this method, the concept of an “average sausage” is used to represent the cluster. The characteristics of a cluster are the centroid or average values of the characteristic of the sausage comprising the cluster. The cluster is then assumed to consist of one average sausage whose characteristics are the centroid. A clear discrimination between samples of different ripening times (days 0, 2, 4, 7, 11 and 14) was revealed, and the position of samples on the plot showed a clear trend related to the progress of production. No significant differences ($P < 0.05$) were found when comparing between product (CH and S samples); thus, the behavior of both types of sausages was very similar throughout ripening. Each of the obtained clusters could be characterized taking into account how different from the overall mean value that the cluster mean was for each studied parameter (Table 2). Cluster 1 explains 33.3 % of the observed variability, and it includes 100 % of both CH and S samples of days 0 and 2 of production. Samples belonging to cluster 1 showed water content, a_w , adhesiveness, T_{2b} , T_{21} , T_{22} and pH mean values above the overall average, while the textural parameters chewiness, gumminess, hardness, springiness and cohesiveness mean values were below the overall average. Cluster 2 explains 37.5 % of the observed variability, and it includes products from day 4 (100 %) and day 7 (91.7 %). Springiness, cohesiveness and T_{22} mean cluster value were above the overall average, while water content and pH were below the overall average. Cluster 3 (20.8 % of the variability) includes products from day 11 (91.7 %). Gumminess, cohesiveness, hardness and chewiness were above the average; however, water content, a_w , adhesiveness T_{21} and T_{22} were below the average. Cluster 4 (8.33 % of the variability) includes products from day 14 of production (50 %). Samples showed chewiness, hardness, gumminess, cohesiveness and springiness mean values above the average and water content, a_w , T_{2b} , T_{22} , T_{21} mean values below the overall average. The differences found between clusters are consistent with the changes in the mobility and distribution of water during the drying process, and the sample classification is governed by the progressive loss of water and the consolidation of a firmer and more structured meat matrix. Moreover, the strong separation between clusters 1 and 2 is probably highly influenced by the on-set of proteolysis during the first ripening days.

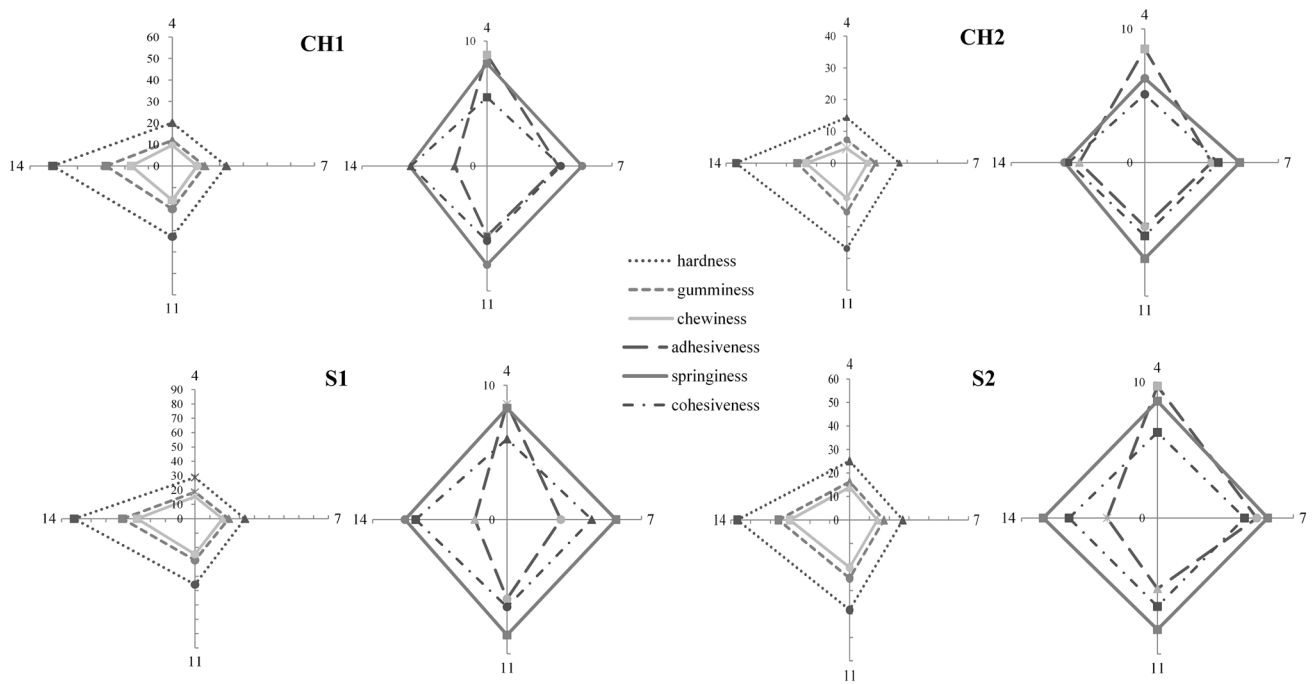


Fig. 4 Textural profile evolution obtained on fermented sausages, batches CH1, CH2, S1 and S2 on days 4, 7, 11 and 14 of production. Mean values of the following parameters were plotted: hardness (N); adhesiveness (Ns) $\times (-10)$; springiness (m) $\times (10)$; cohesiveness (adimensional) $\times (10)$; gumminess (N); chewiness (Nm)

Different symbol within the same line indicates significant differences ($P < 0.05$) throughout ripening time

Relationship between T_2 relaxation time, physicochemical characteristics and textural properties

The degree of association between T_2 relaxation data and physicochemical characteristics as well as the association between T_2 relaxation data and textural properties was investigated using bivariate analysis Pearson product-moment correlation coefficient (PCC). The correlation coefficient for each of the considered pairs is shown in Table 3. A strong correlation was found between the main T_2 population, T_{21} , and physicochemical parameters. A high association degree is shown between T_{21} and a_w ($r = 0.88$, $P < 0.0005$) and T_{21} and water content ($r = 0.94$, $P < 0.0005$). This high degree of association confirms that T_{21} represents a high percentage of the total water content within the sample, contrary to T_{22} and, especially T_{2b} which showed a moderate and low degree of association, respectively, with these parameters. Regarding pH, a high degree of association ($r = 0.68$, $P < 0.0005$) was found with T_{21} , since pH has a great influence on the water-holding capacity of myofibrillar proteins [40]. T_{2b} and T_{22} populations are less related to pH, but a striking finding is the negative

association between pH and T_{22} . According to T_2 distributions, a pH decline is required for the presence of T_{22} , and when the pH reached its lowest value, T_{22} achieved its maximum.

Regarding the textural properties, hardness showed a strong negative correlation with T_{21} ($r = -0.79$, $P < 0.0005$) and T_{22} ($r = -0.63$, $P < 0.0005$), and an intermediate correlation with T_{2b} ($r = -0.40$, $P < 0.0005$). Gumminess and chewiness, as secondary characteristics dependent on hardness, showed a similar degree of dependence with the T_2 populations. Springiness showed a high degree of association with T_{21} ($r = -0.56$, $P < 0.0005$), a low degree of association with T_{22} ($r = -0.18$, non-significant) and moderate degree of association with T_{2b} ($r = -0.32$, $P < 0.005$). Cohesiveness was highly correlated with T_{21} ($r = -0.68$, $P < 0.0005$) and moderately correlated with T_{22} ($r = -0.35$, $P < 0.005$) and T_{2b} ($r = -0.40$, $P < 0.0005$). On the other hand, adhesiveness showed a strong positive correlation with T_{21} ($r = 0.68$, $P < 0.0005$) and T_{22} ($r = 0.60$, $P < 0.0005$) and low degree of association with T_{2b} ($r = 0.28$, $P < 0.005$). Intriguingly, significant associations were also found between water content

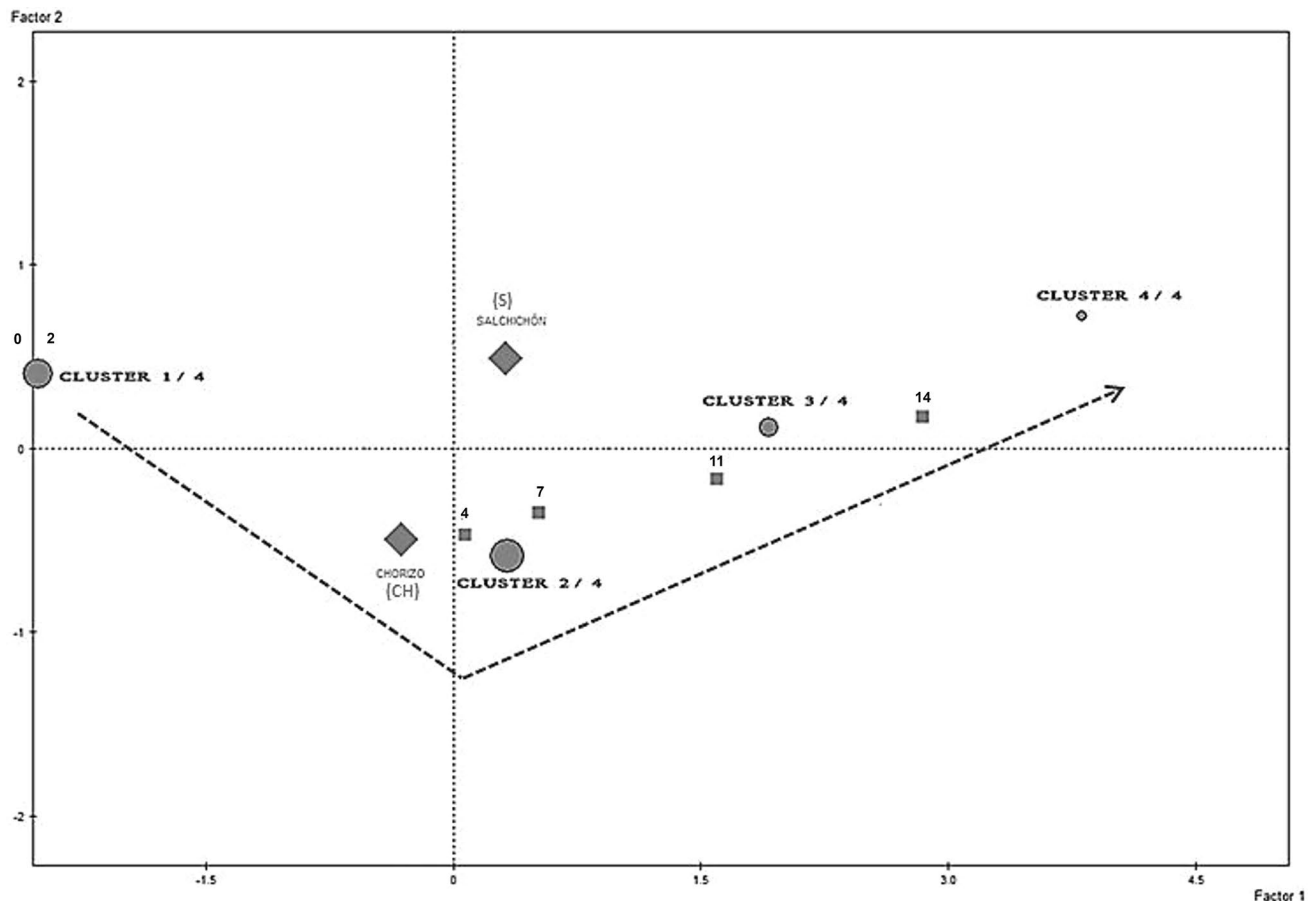


Fig. 5 Plot of the clusters obtained on data acquired on fermented sausage samples using textural features as association parameters. The *centroid* of each cluster is represented. Sample separation was

achieved according to the ripening time (0, 2, 4, 7, 11, 14 days). The direction of the *arrow* reflects the progress of ripening

and textural parameters. A negative correlation was found between water content and hardness, springiness and cohesiveness, while a positive correlation was found between water content and adhesiveness.

Conclusions

Changes in water mobility and distribution during dry-fermented sausage production were detectable by means of LF-NMR. The drying process induced a shift toward shorter T_{21} and T_{22} relaxation times related to the loss of water and the consolidation of a firmer meat matrix. Significant changes were also detected in T_2 relaxation populations in the 1–10 ms region, since two different populations were found at the beginning of the drying process (T_{2b1} and T_{2b2}), and only a single component (T_{2b}) appeared from day 4 on. The study on “chorizo” and “salchichón” (CH and S)

products revealed a similar development in T_2 relaxation behavior throughout ripening, and no significant differences between the two levels of fat included (20 and 40 %) were detected.

A strong linear dependence was found between the main component T_{21} and water content, T_{21} and a_w , as well as between T_{21} and hardness, although the other two T_2 water populations, mainly T_{2b} , showed a lower degree of association with the physicochemical and textural parameters. No significant differences were found when comparing product types (CH and S), suggesting that the drying-induced changes was very similar throughout ripening for the two types of sausages.

Overall, the study has demonstrated the potential of LF-NMR relaxometry to elucidate associations between the biophysical state of intrinsic water and progression in textural properties of dry-fermented meat products. Implications of these findings involve that LF-NMR relaxometry

Table 2 Cluster characterization

Characteristic variables	Cluster mean	Overall mean	Cluster SD	Overall SD	Test value
CLUSTER 1 (33.33 %)					
Water content***	67.543	56.329	5.280	9.459	10.02
a_w ***	0.957	0.928	0.004	0.027	9.24
Adhesiveness***	−0.020	−0.390	0.000	0.351	8.90
T_{21} ***	49.027	39.132	6.731	9.969	8.41
pH***	5.364	5.145	0.321	0.245	7.57
T_{22} ***	305.279	245.047	38.316	74.362	4.42
T_{2b} ***	3.392	2.708	1.813	1.472	3.93
Chewiness***	0.000	0.016	0.000	0.018	−7.46
Gumminess***	5.000	15.658	0.000	11.301	−7.97
Hardness***	4.900	24.898	0.000	19.614	−8.62
Springiness***	0.000	0.001	0.000	0.001	−9.28
Cohesiveness***	0.450	0.553	0.000	0.083	−10.51
CLUSTER 2 (37.50 %)					
Springiness***	0.001	0.001	0.001	0.001	6.10
Cohesiveness***	0.585	0.553	0.047	0.083	3.59
T_{22} *	266.004	245.047	71.202	74.362	2.79
Water content***	52.673	56.329	5.337	9.459	−3.58
pH***	5.007	5.145	0.033	0.245	−5.20
CLUSTER 3 (20.83 %)					
Gumminess***	25.609	15.658	6.625	11.301	5.40
Cohesiveness***	0.624	0.553	0.035	0.083	5.26
Hardness***	40.747	24.898	9.876	19.614	4.96
Chewiness**	0.025	0.016	0.008	0.018	2.97
T_{22} ***	197.310	245.047	41.860	74.362	−3.96
Water content***	49.602	56.329	2.989	9.459	−4.36
T_{21} ***	30.986	39.132	4.657	9.969	−4.91
a_w ***	0.901	0.928	0.005	0.027	−6.12
Adhesiveness***	−0.900	−0.390	0.220	0.351	−8.92
CLUSTER 4 (8.33 %)					
Chewiness***	0.064	0.016	0.010	0.018	9.29
Hardness***	65.886	24.898	15.853	19.614	7.53
Gumminess***	38.358	15.658	10.795	11.301	7.24
Cohesiveness***	0.643	0.553	0.039	0.083	3.92
Springiness***	0.002	0.001	0.000	0.001	3.68
T_{2b} *	1.742	2.708	0.325	1.472	−2.37
Water content***	44.746	56.329	1.119	9.459	−4.42
a_w ***	0.893	0.928	0.003	0.027	−4.66
T_{22} ***	145.642	245.047	15.206	74.362	−4.86
T_{21} ***	24.475	39.132	2.261	9.969	−5.30

Mean values and standard deviation for each cluster against overall values. The percentage of variability explained by the cluster is also included

*** $P < 0.0001$; ** $P < 0.001$; * $P < 0.01$

Table 3 Pearson correlation coefficients matrix for T_2 relaxation times, physicochemical and textural properties

	T_{2b}	T_{21}	T_{22}	a_w	pH	W. cont	Hard	Adh	Spr	Coh	Gum	Chew
T_{2b}												
T_{21}	0.37***			0.34***	0.26**	0.36***	-0.40***	0.28**	-0.32**	-0.40***	-0.40***	-0.39***
T_{22}	0.37***	0.94***		0.88***	0.68***	0.94***	-0.79***	0.69***	-0.56***	-0.68***	-0.73***	-0.70***
a_w	0.22*	0.94***	0.83***		-0.21*	0.87***	-0.63***	0.60***	-0.18*	-0.35***	-0.55***	-0.49***
pH	0.34***	0.88***	0.83***	0.47***		0.90***	-0.81***	0.75***	-0.63***	-0.77***	-0.75***	-0.72***
W. cont	0.26**	0.68***	-0.21*	0.47***	0.74***		-0.37***	0.44***	-0.56***	-0.50***	-0.33***	-0.33***
Hard	0.36***	0.94***	0.87***	0.90***	0.74***	-0.76***		0.73***	-0.68***	-0.75***	-0.66***	-0.66***
Adh	-0.40***	-0.79***	-0.63***	-0.81***	-0.37***	-0.76***	-0.65***		0.67***	0.86***	0.99***	0.96***
Spr	0.28**	0.68***	0.60***	0.75***	0.44***	0.73***	-0.65***	-0.65***		-0.67***	-0.63***	-0.64***
Coh	-0.32**	-0.56***	-0.18	-0.63***	-0.56***	-0.68***	0.67***	-0.72***	-0.72***		0.89***	0.72***
Gum	-0.39***	-0.68***	-0.35**	-0.77***	-0.50***	-0.75***	0.86***	-0.66***	0.90***	0.85***		0.86***
Chew	-0.39***	-0.73***	-0.55***	-0.75***	-0.33**	-0.69***	0.97***	-0.63***	0.67***	0.85***	0.98***	

r near ± 1 reveal a stronger correlation between the considered parameters. T_{2b} : one single measurement was considered in the 1–10 ms region. W. cont: water content; Hard: hardness; Adh: adhesiveness; Spr: springiness; Coh: cohesiveness; Gum: gumminess; Chew: chewiness
 *** $P < 0.0005$; ** $P < 0.005$; * $P < 0.05$

may be used as a tool to study how ingredients and processing parameters affect the ripening process and final product characteristics.

Acknowledgments The present work received financial support from project AGL2010-19158 funded by the Spanish Secretary of State of Research, Development and Innovation within the Ministry of Economy and Competitiveness. HCB wishes to thank the Danish research council FTP for financial support through the project 'Advances in food quality and nutrition research through implementation of metabolomics technologies (#274-09-0169)'.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Compliance with ethics requirements This article does not contain any studies with human or animal subjects.

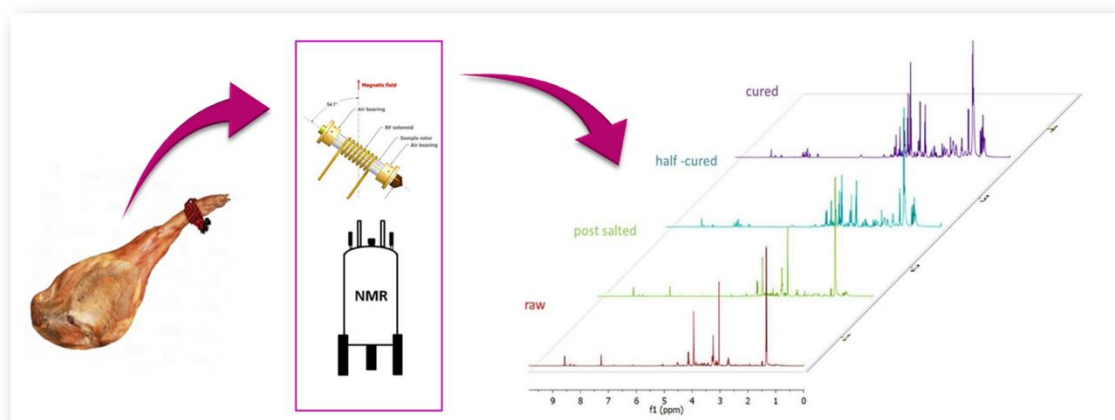
References

- Fernández M, Ordóñez JA, Bruna JM, Herrans B, de la Hoz L (2000) Accelerated ripening of dry fermented sausages. Food Sci Technol 11:201–209
- Caplice E, Fitzgerald JF (1999) Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Int J Food Microbiol 50:131–149
- Campbell-Platt G, Cook PE (1995) Fermented meats, 1st edn. Chapman & Hall, London
- Ordóñez JA, Hierro EM, Bruna JM, de la Hoz L (1999) Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. Crit Revs Food Sci Nutr 39:329–367
- Bertram HC, Andersen HJ (2004) Applications of NMR in meat science. Annu Rep NMR Spectro 53:158–202
- Møller S, Gunvig A, Bertram HC (2010) Effect of starter culture and fermentation temperature on water mobility and distribution in fermented sausages and correlation to microbial safety studied by nuclear magnetic resonance relaxometry. Meat Sci 86:462–467
- Miklos R, Mora-Gallego H, Larsena FH, Serra X, Cheong Z, Xub X, Arnau J, Lametscha R (2014) Influence of lipid type on water and fat mobility in fermented sausage studied by low-field NMR. Meat Sci 96:617–622
- García-García AB, Larsen LB, Cambero MI, Cruz-Díaz K, Bertram HC (2015) Proteolysis process in fermented sausage model systems as studied by NMR relaxometry. J Agric Food Chem 63:3039–3045
- Foegeding EA, Brown J, Drake MA, Daubert CR (2003) Review. Sensory and mechanical aspects of cheese texture. Int Dairy J 13:585–591
- Gimeno O, Ansorena D, Astiasarán I, Bello J (2000) Characterization of chorizo de Pamplona: instrumental measurements of colour and texture. Food Chem 69:195–200
- Mendoza E, García ML, Casas C, Selgas MD (2001) Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. Meat Sci 57:387–393
- Muguerza E, Gimeno O, Ansorena D, Bloukas JG, Astiasarán I (2001) Effect of replacing pork back fat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of Chorizo de Pamplona—a traditional Spanish fermented sausage. Meat Sci 59:251–258
- De la Hoz L, D'Arrigo M, Cambero MI, Ordóñez JA (2004) Development of an n-3 fatty acid and α -tocopherol enriched dry fermented sausage. Meat Sci 67:485–495

14. Houben JH, Van't Hooft BJ (2005) Variations in product-related parameters during standardized manufacture of a semi-dry fermented sausage. *Meat Sci* 69:283–287
15. González-Fernández C, Santos EM, Rovira J, Jaime I (2006) The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage. *Meat Sci* 74:467–475
16. Herrero AM, Ordóñez JA, Romero de Avila MD, Herranz B, de la Hoz L, Cambero MI (2007) Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Sci* 77:331–338
17. Lorenzo J, Franco D (2012) Fat effect on physico-chemical, microbial and textural changes through the manufacture of dry-cured foal sausage lipolysis, proteolysis and sensory properties. *Meat Sci* 92:704–714
18. AOAC, Association of Official Agricultural Chemists (2006) Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 18th edn, 1st rev. AOAC Int, Gaithersburg
19. Carr HY, Purcell EM (1954) Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Am J Physiol* 94:630–638
20. Meiboom S, Gill D (1958) Modified spin-echo method for measuring nuclear times. *Rev Sci Instrum* 29:688–691
21. Butler JP, Reeds JA, Dawson SV (1981) Estimating solutions of 1st kind integral equations with nonnegative constraints and optimal smoothing. *SIAM J Num Anal* 18:381–397
22. Bourne MC (1978) Texture profile analysis. *Food Technol* 32:62–66
23. Ordóñez JA, de la Hoz L (2001) Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Alteraciones. In: Martín & Macías, Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos, vol II, Caceres, pp 1063–1090
24. Herrero AM, de la Hoz L, Ordóñez JA, Herranz B, Romero de Ávila MD, Cambero MI (2008) Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Sci* 80:690–696
25. Ledesma E, Laca A, Rendueles M, Díaz M (2016) Texture, color and optical characteristics of a meat product depending on smoking time and casing type. *Food Sci Technol* 65:164–172
26. Casquete R, Benito MJ, Martín A, Ruíz-Moyano S, Hernández A, Córdoba MG (2011) Effect of autochthonous starter cultures in the production of “salchichón”, a traditional Iberian dry-fermented sausage, with different ripening processes. *Food Sci Technol* 44:1562–1571
27. Marco A, Navarro JL, Folres M (2008) The sensory quality of dry fermented sausages as affected by fermentation stage and curing agents. *Eur Food Res Technol* 226:449–458
28. Gücükoglu A, Küplülü O (2010) The effect of different starter cultures and ripening temperatures on formation of biogenic amine in Turkish fermented sausages. *Eur Food Res Technol* 230:875–884
29. Mokhtar S, Mostafa G, Taha R, Eldeeb GSS (2012) Effect of different starter cultures on the biogenic amines production as a critical control point in fresh fermented sausages. *Eur Food Res Technol* 235:527–535
30. Andersen RH, Andersen HJ, Bertram HC (2007) Curing-induced water mobility and distribution within intra- and extra-miofibrillar spaces of three pork qualities. *Int J Food Sci Technol* 42:1059–1066
31. Bertram HC, Dønstrup S, Karlsson AH, Andersen HJ (2001) Continuous distribution analysis of T_2 relaxation in meat: an approach in the determination of water holding capacity. *Meat Sci* 60:279–285
32. Bertram HC, Karlsson AH, Rasmussen M, Pedersen OD, Andersen HJ (2001) Origin of multiexponential T_2 relaxation in muscle myowater. *J Agric Food Chem* 49:3092–3100
33. Bertram HC, Purslow PP, Andersen HJ (2002) Relationship between meat structure, water mobility, and distribution: a low-field nuclear magnetic resonance study. *J Agric Food Chem* 50:824–829
34. Venturi L, Rocculi P, Cavani C, Placucci G, Rosa MD, Cremonini MA (2007) Water absorption of freeze-dried meat at different water activities: A multianalytical approach using sorption isotherm, differential scanning calorimetry, and nuclear magnetic resonance. *J Agric Food Chem* 55:10572–10578
35. Li Y, Jia W, Zhang CH, Li X, Wang LC, Zhang DQ, Mu GF (2014) Fluctuated low temperature combined with high-humidity thawing to reduce physicochemical quality deterioration of beef. *Food Bioprocess Tech* 7:3370–3380
36. Stangierski J, Baranowska HM (2015) The influence of heating and cooling process on the water binding in transglutaminase-modified chicken protein preparation, assessed using low-field NMR. *Food Bioprocess Technol* 8:2359–2367
37. Gordon A, Barbut S (1992) Mechanisms of meat batter stabilization: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32:299–332
38. Shao J, Deng YM, Song L, Datur A, Jia N, Liu DY (2016) Investigation of the effects of protein hydration states on the mobility water and fat in meat batters by LF-NMR technique. *Food Sci Technol* 66:1–6
39. Roca M, Incze K (1990) Fermented sausages. *Food Rev Int* 6:91–118
40. Huff-Lonergan E, Lonergan S (2005) Mechanisms of water-holding capacity of meat: the role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci* 71:194–204

IV.2. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE DERIVADOS CÁRNICOS Y EXUDADOS CÁRNICOS MEDIANTE ESPECTROSCOPÍA DE ^1H RMN DE ALTA RESOLUCIÓN

La segunda parte de esta Tesis Doctoral recoge tres trabajos (5 a 7), en los que se describen los resultados obtenidos tras el desarrollo del segundo objetivo.



Trabajo 5

Monitorización del proceso de elaboración de jamón curado mediante espectroscopía de RMN de alta resolución

Enviado a *Journal of Food Composition and Analysis*

Para estudiar el proceso de maduración de jamón desde un punto de vista bioquímico, en el **Trabajo 5** se recurrió a la espectroscopía de RMN en combinación con la sonda HRMAS (*high resolution magic angle spinning*) para analizar las transformaciones metabólicas ocurridas durante la elaboración del producto. Los resultados de este trabajo corresponden a los primeros experimentos realizados para monitorizar el proceso de maduración completo a partir de muestras íntegras, sin preparación o derivatización previa. A medida que avanzó el curado, se observaron diferencias significativas en los aminoácidos libres y carbohidratos, relacionadas con los procesos proteolíticos y glucolíticos típicos de la maduración. La degradación de nucleótidos también fue observada y las señales de ácidos grasos libres mostraron un aumento de la intensidad, favorecido por la lipólisis. Los aminoácidos y los ácidos grasos libres, como era de esperar, fueron las señales en las que las transformaciones se hicieron más visibles debido a la concentración de solutos que tiene lugar debido a la deshidratación del producto. Los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), en particular, experimentaron una evolución notable. Se realizó, además, una cuantificación de metabolitos, mediante la integración de las señales aromáticas de los espectros para conocer la intensidad de los metabolitos identificados y establecer proporciones para obtener un modelo útil para supervisar el proceso de maduración.

Por consiguiente, la innovadora metodología ^1H RMN HRMAS ha resultado ser una herramienta con gran potencial para supervisar la fabricación de jamón serrano.

Use of ^1H HR-MAS NMR Methodology for Monitoring Dry Cured Ham Manufacturing

A.B. García-García^a; D. Castejón^b; P. Villa^b; R. Escudero^a; M.I. Cambero^{a*}

^a) Sección Departamental de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Spain.

^b) Centro de Asistencia a la Investigación de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico. Universidad Complutense de Madrid. 28040. Madrid. Spain.

*Corresponding author. Tel: +34 913943745; Fax: +34 913943743; E-mail: icambero@vet.ucm.es

Abstract: Three different muscles (*biceps femoris*, *semimembranosus* and *semitendinosus*) of hams at different manufacturing times were analyzed by means of ^1H NMR spectroscopy. Results reported in this paper correspond to the first ^1H NMR HRMAS experiments achieved in order to monitor the entire ripening process. The PCA analysis of the NMR dataset allowed to classify samples according to the ripening time. As curing time progressed, significant differences were detected in free amino acids and carbohydrates regions related to characteristic proteolysis and glycolysis processes. Degradation of nucleotides was also observed and an increase in the intensity of fatty acids signals was shown according to the intense dehydration suffered for muscular tissue during ripening. Aromatic amino acids, in particular, experienced a notable evolution. Integration of their aromatic signals of the spectra was performed, in order to know the intensity of the detected compounds and to set ratios to obtain a useful model to monitor the ripening process. Consequently, the innovative ^1H NMR HRMAS methodology has proven to be a suitable tool in order to monitor cured ham manufacturing.

Key words: dry-cured ham, ripening, metabolite profile, ^1H NMR HRMAS

1. Introduction

Dry-cured ham is a traditional meat product highly appreciated by consumers. Its production is a time-consuming process which varies between different ham types. There are many factors affecting the final characteristics of dry-cured ham. The quality of the raw material and the process conditions mainly influence the rate and the extent of biochemical reactions which are in turn responsible for the formation of specific flavor and texture (Ventanas, 2001). Given the technological and economic importance of this product, the development of suitable analytical tools is essential to know the quality of the meat at its best, both structurally and compositionally. Understanding what changes and transformations happen in each stage of production would allow to evaluate ham features and quality under different processing conditions. To realize this work on so valuable samples it is necessary to use non-destructive technologies. High resolution Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy is a well-established technique that, when applied to complex mixtures, allows the simultaneous detection of a large number of their low molecular weight components (Bales et al., 1984; Wishart, 2008). Hence, NMR spectroscopy is gaining wide acceptance in food analysis due to its potential for giving very exhaustive representations of the chemical composition of the food matrix without extensive manipulation (Manina et al., 2011; Cheng et al., 2013; Mazzei et al., 2017). For this goal, the NMR spectroscopy modality known as High Resolution Magic Angle Spinning (HRMAS) has proved to be very useful for reliably assessing the metabolic profile (metabolome) of intact muscle samples (Ritota et al., 2012; Mazzei et al., 2017; Sundekilde et al., 2017). Thus, this modality has been applied to investigate factors that somehow affect meat properties, such as the geographical origin of cattle (Jung et al., 2010), type of breeds (Ritota et al., 2015), the characterization of metabolic changes during beef meat ageing (Castejón et al., 2015) or meat derivatives composition (García-García et al., 2018). Nevertheless, in comparison with other foods, meat has hardly been investigated by NMR and, still less, the examination of a process as complex as the production of dry cured ham.

The study of ham implies the evaluation of a very heterogeneous product constituted by several muscles with very different features, such as composition, and therefore it is possible that they are affected in different ways for the diverse processes that the ham suffers during the manufacturing process (Arnau et al., 1995). Therefore, the aim of this work was: i) to classify samples according to the ripening time and ii) to assess the potential of the innovative ^1H NMR HRMAS methodology to rapidly identify the presence of the main metabolites of three different intact pork leg muscles and iii) to monitor their evolution throughout ripening, from a very small sample amount with minimum preparation.

2. Material and methods

2.1. Samples

Raw hams obtained from white-breed pigs, *Landrace x Landrace White* female animals of 10-11 kg live weight, were purchased from the manufacturing plant Incarlopsa (Tarancón, Cuenca) at the following stages: raw (3 days after slaughter), during salting (after salt addition, in the first

2-3 days of processing), post-salting (hams taken during the resting period after salt removal), half-cured (half-cured hams taken after 6 and 8 months of processing) and cured (fully matured hams after 12 and 20 months of processing). Salting and post-salting were managed at low temperature (0-4 °C); two different processing conditions were established during maturing: a cold period (13-15 °C, RH: 75-85%) and a warm period (22-26 °C, RH: 60-75%) and ageing was performed at room temperature (12-17 °C, RH: 60-80), in conformity with Santos et al., 2008. Once the bones, skin and fat had been removed, muscles corresponding to different anatomical locations (*biceps femoris*, *semimembranosus* and *semitendinosus*) were taken from the lean tissue. The visible fat and connective tissue were totally removed from the muscles pieces. Manufacturing process and sample collection was carried out according to García-García et al., 2018. The effect of ripening time on the metabolite profile was studied by analyzing one sample of each muscle at each processing time, representing a total of 21 separate analyses.

2.2. NMR experiments

About 8–10 mg of lean tissue of each of the muscles studied was examined using HR-MAS at 4 °C to minimize tissue deterioration and avoid degradation of thermolabile compounds. ¹H NMR HRMAS spectroscopy was carried out at 500.13 MHz using a Bruker AMX500 spectrometer 11.7T.

The samples were placed into a 50 µl zirconium oxide rotor with a cylindrical insert, together with 20 µl of 0.1mM solution of TSP in D₂O. D₂O (99.9%) and sodium (3-trimethylsilyl)-2,2,3,3-tetradeuteriopropionate (TSP) were purchased from SDS and Sigma–Aldrich, respectively. Experimental runs were performed at the lowest possible spinning rates to minimize structural or chemical changes during analysis.

Standard solvent suppressed spectra (NOESYPRESAT) were acquired into 16 k data points, averaged over 256 acquisitions. The total acquisition time was ~14 min, with a relaxation delay of 2 s, a mixing time of 150 ms and a spectral width of 8333 Hz. All spectra were processed using MestReNova 9.0.1 (Mestrelab Research SL, Santiago de Compostela, Spain) and TopSpin 2.1 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany). Prior to Fourier transformation, the FIDs were multiplied by an exponential weight function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz. Spectra were phased, baseline-corrected and referenced to the TSP at $\delta = 0$ ppm. For some of the analyzed samples, 1D CPMG experiments were also performed to attenuate contribution from high molecular weight metabolites. Two-dimensional (2D) homonuclear ¹H-¹H (COSY and TOCSY) NMR experiments were also measured on the pork samples, and the resulting 2D spectra were used to assist in assigning signals from ¹H HR-MAS NMR spectra. Between consecutive 2D spectra, a control ¹H NMR spectrum was always measured to ensure that the sample remains uncharged.

2.3. Spectral assignment

Assignment of resonances in the ^1H NMR spectra from beef exudates was based on both spin connectivity information obtained from 2D experiments and the use, as guidelines, of both data reported in the literature (Castejón et al., 2015), and data obtained from HMDB database (Human Metabolite Data Base <http://www.hmdb.ca/>).

2.4. Statistical analysis

Multivariate statistical analysis was conducted on NMR data. A total of 21 ham spectra were subjected to PCA using AMIX software (version 3.9.11, Bruker BioSpin). Prior to the multivariate analyses, each individual spectrum was data reduced over the 9.0–0.5 ppm range by dividing it into spectral regions (buckets) of 0.04 ppm each. Some regions (i.e. unsuppressed water region and fat signals) were excluded from the bucketing. In order to account for the variable concentration of each reconstituted sample, its bucket intensities were normalized to the total spectral intensity over the whole spectrum. The number of principal components (PCs) employed for PCA was established as the minimum required to explain 95% of the total variance. Significance analysis of variables (buckets) was based on the procedure of Goodpaster et al., 2010) using a confidence level of 95%.

3. Results and discussion

3.1. Samples classification by PCA

Unsupervised multivariate analysis by PCA is a useful tool to classify a set of individuals into homogeneous groups. The whole data set of bucket-reduced ^1H NMR spectra for 21 ham samples was analyzed. Fig. 1A shows the scatter plot of PC1 vs PC2. PC1 and PC2 explain 62.32% and 10.77% of the total variance, respectively. A clear discrimination between samples of different ripening time was revealed, suggesting that the total spectra contain useful information for sample classification and to monitor and predict the maturation degree of the samples analyzed. Fig. 1B shows the main buckets responsible of the variation between groups (red color).

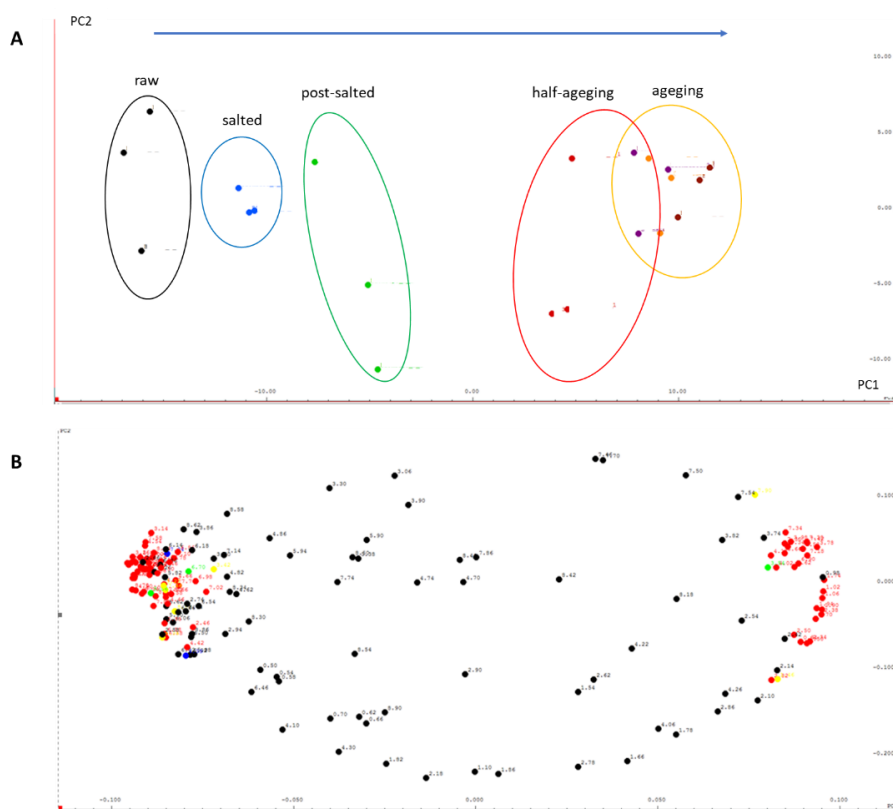


Figure 1. A. PC1 vs PC2. Each point represents one single sample. The direction of the arrow indicates the progress of ripening. B. Significant buckets involved in the discrimination between groups.

The principal metabolites contained within these buckets are shown in Table 1. These are mainly amino acids, followed by carbohydrates and nucleosides. Although it would be expected that the fats also had an important role in this ordering, it is necessary to remark that to perform this multivariate analysis the intense fat signals were disregarded.

Table 1. Spectral region (ppm) showing significant differences during processing ($P < 0.05$). The table includes the assignment of the main metabolites present in each region and their variation during ripening.

Spectral region (ppm)	p-value	Metabolite	Variation during ripening
0.94	5.14E-05	Isoleucine (Ile)	↑
0.98	4.87E-08	Leucine (Leu)	↑
1.02	2.36E-08	Isoleucine (Ile)	↑
1.06	4.90E-08	Valine (Val)	↑
1.50	1.29E-06	α -Alanine (α -Ala)	↑
1.70	2.02E-06	Arginine (Arg)	↑
1.74	5.84E-10	Leucine (Leu)	↑
1.90	5.92E-08	Lysine (Lys)	↑
1.94	1.20E-07	Acetic acid (AA)	↑
2.34	4.36E-07	γ -Aminobutyric Acid (GABA)	↑
2.38	2.62E-08	Glutamate (Glu)	↑

2.46	2.04E-05	Glutamine (Gln)	↑
2.66	9.24E-07	Citric acid (CA)	--
2.70	3.67E-07	Anserine (Ans)	↑
2.98	2.26E-08	Glutathione (GSH)	--
3.02	1.69E-07	γ-Aminobutyric Acid (GABA) Creatine/Phosphocreatine (Cr/PCr)	--
3.10	1.67E-07	Carnosine (Car)	--
3.14	2.97E-05	Phenylalanine (Phe)	↑
3.18	2.05E-06	Choline (Cho)	↑
3.26	4.40E-07	Anserine (Ans)	↑
3.34	2.75E-05	Proline (Pro)	↑
3.46	2.07E-06	Carnitine (Cart) / β-Glucose (β-Glc)	↓
3.50	1.01E-06	β-Glucose (β-Glc)	↓
3.54	7.73E-06	α-Glucose (α-Glc)	↓
3.58	7.71E-08	Glycerol	↑
3.62	6.58E-06	Phosphocholine (Pcho)	↑
3.66	8.79E-07	Glycerol	↑
3.78	4.00E-09	α-Alanine (α-Ala)	↑
3.94	1.26E-07	Creatine/Phosphocreatine (Cr/PCr)	--
3.98	6.41E-06	α-Glucose (α-Glc)	↓
4.02	3.27E-05	Creatinine (Crn) / Choline (Cho)	--
4.14	4.22E-06	Lactic Acid (LA)	--
4.18	2.60E-05	Phosphocholine (Pcho)	--
4.42	3.12E-06	Inosine (Ino)	↑
4.50	9.80E-08	Inosine 5'-phosphate (IMP)	--
4.54	1.22E-05	Anserine (Ans)	↑
4.58	1.38E-05	Glutathione (GSH)	↑
4.66	9.28E-06	β-Glucose (β-Glc)	↓
4.78	7.77E-08	Inosine 5'-phosphate (IMP) / Inosine (Ino)	↑
6.10	1.75E-10	Inosine (Ino)	↑
6.82	6.10E-07	Tyramine (Tyrm)	↑
6.90	9.73E-06	Tyrosine (Tyr)	↑
7.10	1.50E-05	Tyramine (Tyrm)	↑
7.18	1.74E-06	Tyrosine (Tyr) / Tryptophan (Trp)	↑
7.26	1.30E-06	Carnosine (Car) / Anserine (Ans) / Tryptophan (Trp)	↑
7.30	3.95E-05	Trp	↑
7.34	2.15E-05	Phenylalanine (Phe)	↑
7.38	5.33E-07	Phenylalanine (Phe)	↑
7.42	3.53E-07	Phenylalanine (Phe)	↑
7.58	1.44E-05	Nicotinic Acid (NA)	↑
8.22	4.81E-07	Hypoxanthine (Hx)	↑
8.26	6.42E-07	Inosine 5'-phosphate (IMP)	↑
8.38	2.59E-08	Inosine (Ino)	↑
8.94	1.25E-06	Nicotinic Acid (NA)	--

3.2. Metabolite evolution during the manufacturing process

Although the three most important muscle of ham were studied, in this paper, the main emphasis is on semimembranosus muscle (SM). Figure 2 shows the spectra obtained for SM at different ripening times and the assignation of the main signals detected.

Biceps femoris (BF) is an internal muscle covered with a thick layer of subcutaneous fat on one side; this slows down salt uptake, and salt content slowly increases throughout the process. The slow increase in salt contributes to higher proteolytic activity in this muscle, which influences the final textural properties (Virgili et al., 1998; Ruíz-Ramírez et al., 2006; Zhao et al., 2008). On the other hand, SM muscle is situated close to the surface without fat covering. It results in a fast salt uptake during the salting stage (Parreno et al., 1994). As expected (Flores et al., 1997; Toldrá, 2006), the *semitendinosus* (ST) muscle presented the higher fat content. Since the extent of biochemical changes during the manufacturing process is different for these three muscles, the same trend was found during ripening and SM was used as the marker muscle for the monitorization of the metabolic changes during the manufacturing process.

As dry-curing time progressed, significant differences in several regions of the spectra were observed, including the increase in the intensity of fatty acids signals, the degradation of nucleotides, the degradation of carbohydrates, and the increase of the amino acids (mainly aromatics) related to proteolysis process.

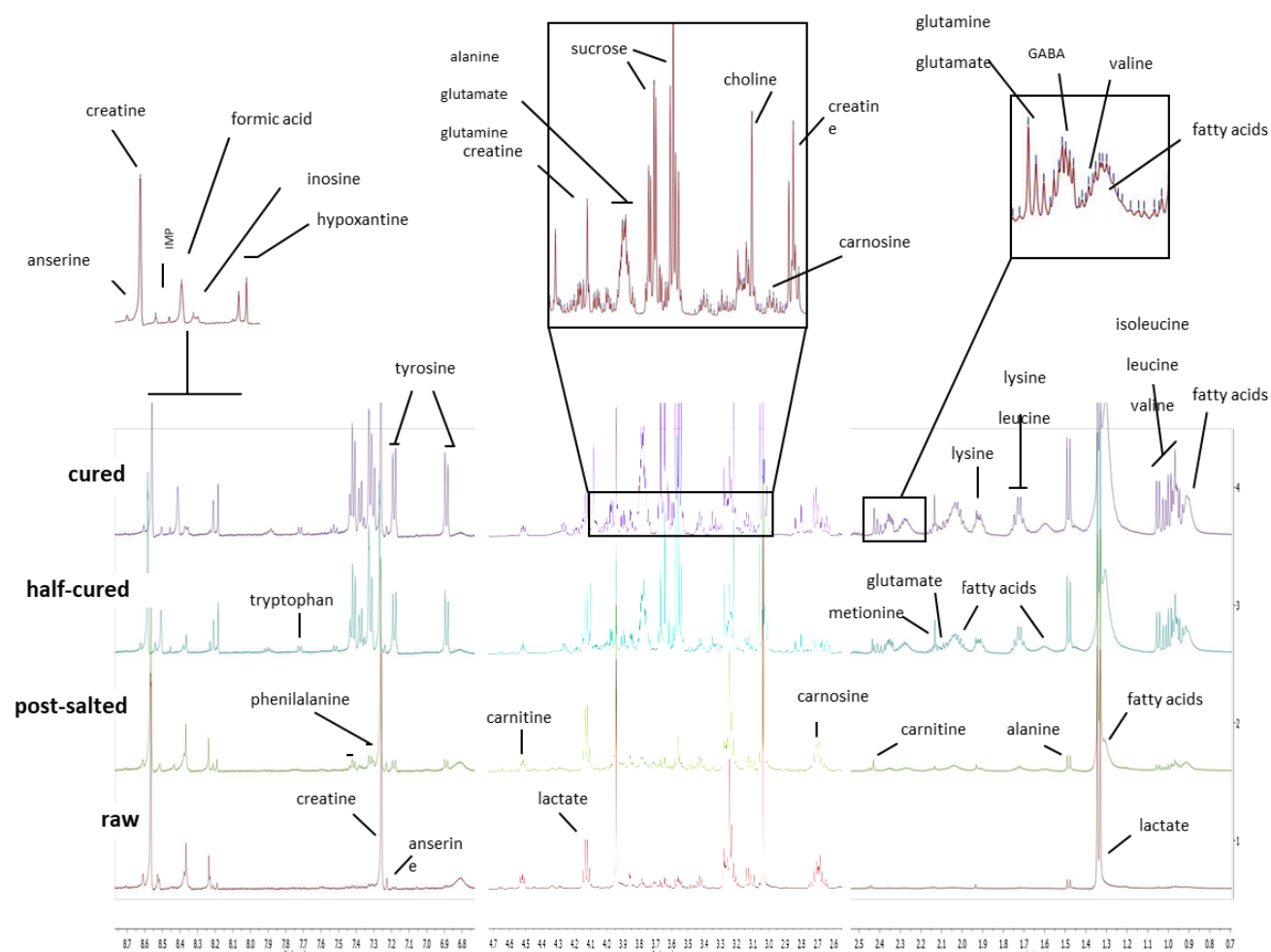


Figure 2. Assignment of the main signals in ^1H NMR spectra obtained for SM muscle at different processing times. A: raw ham; B: post-salted, C: half-cured, D: cured.

3.2.1. Proteolysis during dry cured ham manufacturing

All amino acids exhibited increased concentration during the long process. Though the enzymatic activity decreases, in the final stages of the process (Ruíz-Ramírez et al., 2006; Zhao et al., 2005; Harkouss et al., 2015), the increase in the signals corresponding to free amino acids was remarkable, such as the aromatic amino acids (Figure 3), due to the concentration of compounds related to dehydration.

Dipeptides such as carnosine (β -ala-his) and anserine (β -ala-1-methyl-his) also increased during the process. Nishimura and Kato, (1988) reported that both dipeptides had notable buffer action at pH > 6.0 and thereby were important in the improvement of taste since the taste effects of ionic components of foods are strongly dependent on pH (Fuke and Konosu, 1991). Concentrations of free amino acids found in long-processed hams were similar to those reported by Aristoy and Toldrá (1991) for a Spanish dry-cured ham.

Previous studies have indicated that these amino acids play an important role in the aroma and flavour development of hams. They can be used as markers of the dry-curing process.

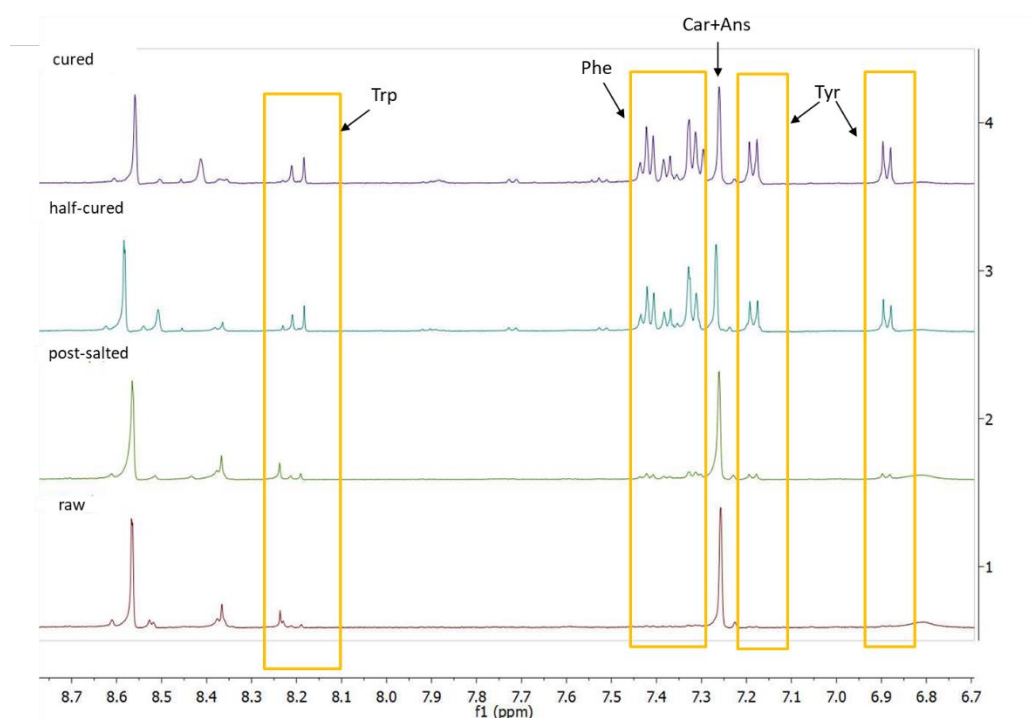


Figure 3. Changes in aromatic signals of ^1H NMR HRMAS-spectra of *Semimbranosus* muscle during ripening. Trp: tryptophan; Phe: Phenilalanine; Tyr: Tyrosine; Car: Carnosine; Ans: Anserine

3.2.2. Lipolysis during dry cured ham manufacturing

A quantitative variation in lipid compounds was detected and an increase in the release of free fatty acids during fermentation stage and at the end of ripening, as shown in Figure 4. This finding was the result of the lypolysis of intramuscular lipids that contribute to the formation of the final dry-cured ham flavor. The increase in the relative intensities of the fatty acid signals was revealed as ripening proceeded, a phenomenon favored by the concentration of solutes by progressive

dehydration of samples, since the lipolytic activity remain constant during processing (Virgili et al., 1998).

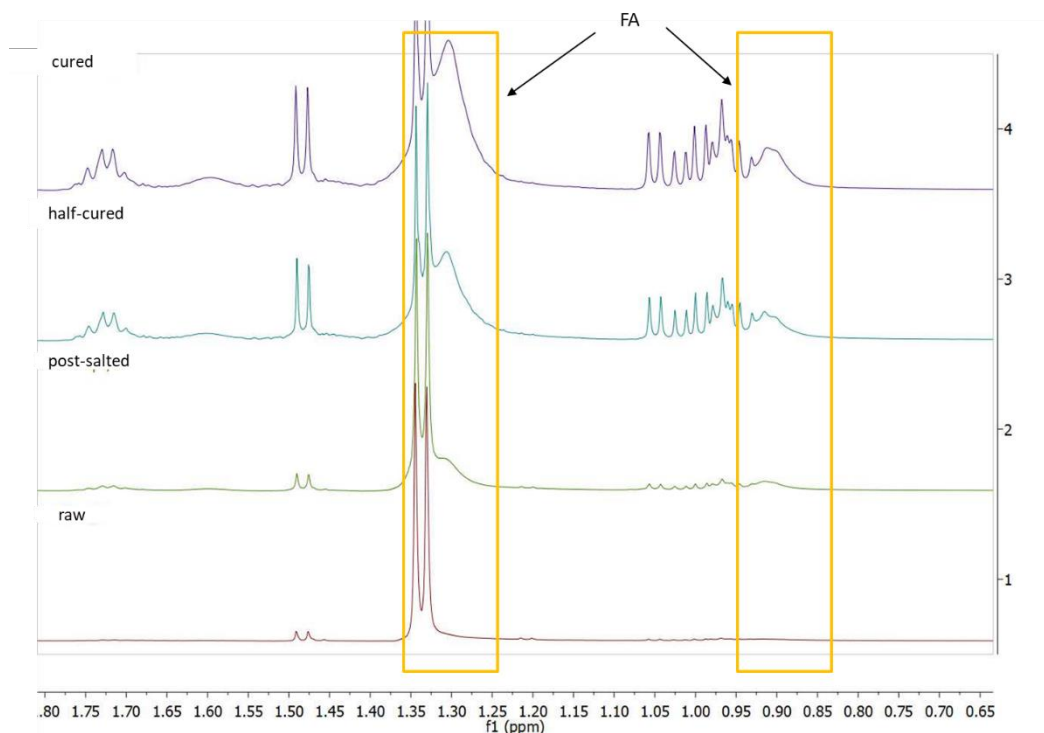


Figure 4. Changes in fatty acids signals of ^1H NMR HRMAS-spectra of *Semimbranosus* muscle during ripening. FA: fatty acids.

3.3. Ripening time predictive model

The aromatic signals are highly related to the final characteristics of the product and they are quite representative of the process, since they show up during the entire process and they are not overlapped with closer signals. For these reasons, integration of these signals of the spectra (Figure 3) was performed, in order to know the intensity of the detected compounds and to set ratios to obtain a useful model to monitor the ripening process (Table 2).

The resultant equation was:

$$\text{Ripening period} = 0,013 + 37,25 \cdot \text{Trp}^2 - 0,823 \cdot \text{Tyr}^2 - 2,073 \cdot \text{Phe} \cdot \text{Trp} + 0,305 \cdot \text{Phe} \cdot \text{Tyr} + 1,394 \cdot \text{Tyr} - 6,861 \cdot \text{Trp} \quad (R^2=0,98)$$

where ripening period values < 1 correspond to raw ham; values within the range ≥ 1 and < 2 correspond to post salted ham; values within the interval ≥ 2 and < 3 correspond to half-cured ham and values ≥ 3 correspond to cured ham].

Table 2. Regression model for ripening time using aromatic amino acids signal intensity. (Phe: phenilalanine; Trp: tryptophan; Tyr: tyrosine)

Dependent variable	R ²	SE	Independent variable	Coefficient	F-ratio	P-value
Ripening time	98.544	0.209	Constant	0.013		
			Trp*Trp	37.25	29.12	0.0030
			Tyr*Tyr	-0.823	32.70	0.0023
			Phe*Trp	-2.073	28.02	0.0032
			Phe*Tyr	0.305	28.76	0.0030
			Tyr	1.394	24.55	0.0043
			Trp	-6.861	11.44	0.0196

4. Conclusions

As far as we know, this is the first ¹H NMR study of dry-cured ham manufacturing, where the complete metabolite profile of intact BF, SM and ST muscles and their evolution throughout ripening was reported. The applied ¹H NMR HRMAS methodology has been found to be a rapid and effective technique to monitor the changes associated with the drying-curing processes. The non-invasive analysis (just a needle of biopsy is required) proposed along the whole ripening process allows to create predictive models that facilitate the monitoring and control of processing, as well as to evaluate the possible effects that occur on the metabolic profile as a consequence of modifications in the ripening conditions (temperature, humidity, time...). Consequently, ¹H NMR HRMAS spectral profiles of dry-cured products can be very useful in evaluating the metabolome variations as a function of different muscle processing conditions.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of UCM-BSCH Group 920176GR35/10A, project AGL2010-19158 funded by the Spanish Secretary of State of Research, Development and Innovation within the Ministry of Economy and Competitiveness and the cooperative collaboration with the members of the CAI of NMR and RSE (UCM). A.B.G.G. was awarded a grant (BES-2011-047485) from the same institution.

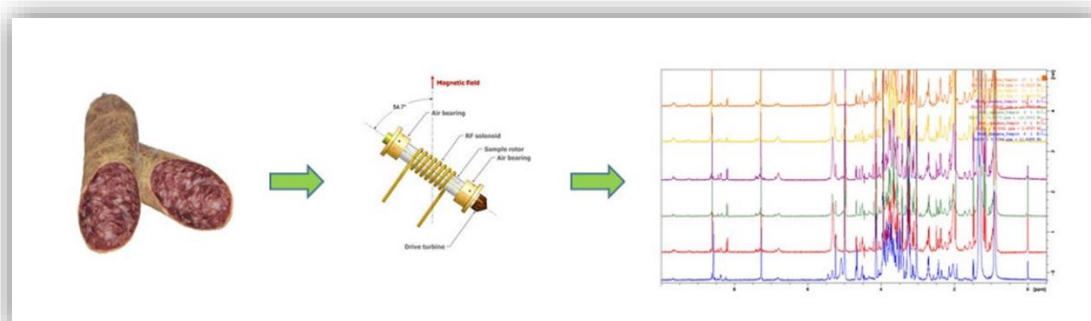
References

- Virgili, R., Schivazappa, C., Parolari, G., Bordini, C. S., Degni, M. (1998). Proteases in fresh pork muscle and their influence on bitter taste formation in dry-cured ham. *Journal of Food Biochemistry*, 22, 53-63.
- Ruiz-Ramirez, J., Arnau, J., Serra, X., Gou, P. (2006). Effect of pH24, NaCl content and proteolysis index on the relationship between water content and texture parameters in biceps femoris and semimembranosus muscles in dry-cured ham. *Meat Scenc,i* 72, 185-194.
- Zhao GM, Tian W, Liu YX, Zhou GH, Xu XL, Li MY (2008) Proteolysis in biceps femoris during Jinhua ham processing. *Meat Science*, 79, 39–44.
- Harkouss, R., Astruc, T., Lebert, A., Gatellier, P., Loison, O., Safa, H., Portanguen, S., Parafita, E., Mirade, P. S. (2015). Quantitative study of the relationships among proteolysis, lipid oxidation, structure and texture throughout the dry-cured ham process. *Food Chemistry*, 166, 522-530.
- Ventanas, J. (2001). Factores del proceso que determinan la calidad del jamón. En: Jamón Ibérico y Serrano. Fundamentos de la elaboración y de la calidad. Ed. Paraninfo, Madrid: pp. 63-103
- Wishart, D.S. (2008). Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27, 228-237.
- Bales, J.R., Higham, D.P., Howe, I., Nicholson, J K., Sadler, P.J. (1984). Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. *Clinical chemistry*, 30, 426-432.
- Mannina, L., Sobolev, A.P., Viel, S. (2012). Liquid state ¹H high field NMR in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 66, 1-39.
- Mazzei, P., Piccolo, A., Valentini, M., & Webb, G.A. (2017). Intact Food Analysis by Means of HRMAS-NMR Spectroscopy. In: Web G. (eds.) *Modern Magnetic Resonance*, 1-16.
- Arnau, J.; Guerrero, L.; Casademont, G.; Gou, P. (1995). Physical and chemical changes in different zones of normal and pse dry-cured ham during processing. *Food Chemistry*, 52, 63-9.
- Cheng, J.H., Dai, Q., Sun, D.W., Zeng, X.A., Liu, D., Pu, H.B. (2013). Applications of non-destructive spectroscopic techniques for fish quality and safety evaluation and inspection. *Trends in food science & technology*, 34, 18-31.
- Ritota, M., Casciani, L., Failla, S., Valentini, M. (2012). HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis meat characterisation. *Meat science*, 92, 754-761.
- Sundekilde, U.K., Rasmussen, M.K., Young, J.F., Bertram, H.C. (2017). High resolution magic angle spinning NMR spectroscopy reveals that pectoralis muscle dystrophy in chicken is associated with reduced muscle content of anserine and carnosine. *Food chemistry*, 217, 151-154.
- Jung, Y., Lee, J., Kwon, J., Lee, K.S., Ryu, D.H., Huang, G.S. (2010). Discrimination of the Geographical Origin of Beef by ¹H NMR-Based Metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10458–10466.
- Ritota, M., Casciani, L., Failla, S., Valentini, M. (2015). HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis meat characterization. *Meat Science*, 92, 754–761.
- Castejón, D., García-Segura, J.M., Escudero, R., Herrera, A., Cambero, M.I. (2015). Metabolomics of meat exudate: Its potential to evaluate beef meat conservation and aging. *Analytical Chemical Acta*, 901, 1 – 11.
- García-García, A.B., Lamichhane, S., Castejón, D., Cambero, M.I., Bertram, H.C. (2018). ¹H HR-MAS NMR-based metabolomics analysis for dry-fermented sausage characterization *Food Chemistry*, 240, 514-523.
- García-García, A.B., Fernández-Valle, M.E., Castejón, D., Escudero, R., Cambero, M.I. (2018). Use of MRI as a predictive tool for physicochemical and rheological features during cured ham manufacturing. *Meat Science* (under revision).
- Santos, C., Hoz, L., Cambero, M.I., Cabeza, C., & Ordóñez, J.A. (2008). Enrichment of dry-cured ham with α -linolenic acid and α -tocopherol by the use of linseed oil and α -tocopheryl acetate in pig diets. *Meat*

García-García et al., **2018**, enviado a Journal of ***Food Composition and Analysis***, IV.2.5, 1-13

Science, 80, 668-674.

Goodpaster, A. M., Romick-Rosendale, L. E., & Kennedy, M. A. (2010). Statistical significance analysis of nuclear magnetic resonance-based metabonomics data. *Analytical Biochemistry*, 401, 134–143.



Trabajo 6

Identificación de los principales metabolitos presentes en embutidos crudos curados y evolución de los mismos durante el proceso de maduración

Publicado en *Food Chemistry*, 240 (2018), 514-523

Los productos madurados experimentan importantes transformaciones durante su elaboración que no solamente afectan a sus características estructurales, sino también a los aspectos relacionados con su bioquímica y composición. Los fenómenos proteolíticos y lipolíticos, entre otros, modifican notablemente durante el proceso las características de la fracción proteica y lipídica original, respectivamente, y tienen importantes consecuencias sobre las características del producto final, estando implicados en el desarrollo del aroma y sabor típicos de los embutidos madurados.

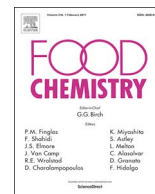
Con el fin de monitorizar los cambios bioquímicos acaecidos durante la maduración, y de esta forma, contar con una visión global de los cambios madurativos, en el **Trabajo 6** se llevó a cabo el estudio del perfil metabólico de embutidos tipo salchichón mediante la espectroscopía ^1H RMN HRMAS. Aunque esta metodología ha visto incrementado su empleo en el análisis de alimentos en los últimos años, este es el primer estudio realizado para elucidar el perfil metabólico en muestras intactas de embutido. Se identificaron un gran número de metabolitos, tanto originales de la carne como de adición, y fue posible estudiar su variación cuantitativa durante las etapas de fermentación y maduración. El análisis metabolómico de las muestras analizadas permitió diferenciar los procesos de fermentación y maduración e hizo posible la clasificación de las muestras en función del tiempo de maduración a través del Análisis de Componentes Principales (PCA).

De este estudio se concluye que la espectroscopía ^1H RMN HRMAS es una herramienta rápida y eficaz para monitorizar los cambios bioquímicos asociados a la fermentación y a la maduración de productos curados.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

¹H HR-MAS NMR-based metabolomics analysis for dry-fermented sausage characterization



Ana Belén García-García^a, Santosh Lamichhane^c, David Castejón^b, M^a Isabel Cambero^a,
Hanne Christine Bertram^{c,*}

^a Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b CAI de Resonancia Magnética Nuclear y Espín Electrónico, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^c Department of Food Science, Aarhus University, Research Centre Aarslev, Kirstinebjergvej 10, DK-5792 Årlev, Denmark

ARTICLE INFO

Keywords:

Dry-fermented sausages

Fermentation

Ripening

¹H HR-MAS NMR spectroscopy

Meat metabolites

Culinary meat

ABSTRACT

Proton high-resolution magic angle spinning (¹H HR-MAS) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in combination with principal component analysis (PCA) was employed to characterize dry-fermented sausages *salchichón* type throughout the manufacturing process. ¹H HR-MAS NMR metabolite profiling was achieved from a small sample of intact sausage after 0, 2, 4, 7, 11 and 14 days of drying. Intriguingly, the obtained results enabled the identification of the three main stages in the traditional production of *salchichón*. Formulation, fermentation and drying-ripening periods showed distinct and characteristic metabolomic profiles. Compositional changes related to microbial activity, as well as proteolytic and lipolytic phenomena, decisive steps in such a ripening process, could be monitored through the NMR spectra. This study shows the potential of ¹H HR-MAS as a rapid method for probing metabolomic profiles and compositional changes during sausages processing.

1. Introduction

Drying represents one of the oldest forms of meat preservation. Within the category of cured meat products, *salchichón* is one of the most popular dry sausage type produced and consumed in Spain. The main distinguishing feature of this group of meat products is that they rely on microbial fermentation to achieve their final properties. Production occurs by stimulating the growth of the desired fermentation microbiota, while the growth of spoilage bacteria is suppressed, mainly due to the pH decline in the product and the controlled decrease of moisture, related to water activity (a_w) reduction (Fernández, Ordóñez, Bruna, Herranz, & de la Hoz, 2000). In naturally produced dry-fermented sausages without starter cultures, the typical microbiota (lactic acid bacteria (LAB) and *Micrococcaceae*) highly contributes to obtain the desired taste, appearance and texture of fermented sausages (Ordóñez, Hierro, Bruna, & de la Hoz, 1999). However, the final properties of the product depend not only upon the products of carbohydrate fermentation but are also strongly influenced by biochemical and physical changes occurring during the drying process with the consequence of more concentrated flavour components and firmer sausage texture (Fernández-López, Sendra, Sayas-Barberá, Navarro, & Pérez-Álvarez, 2008).

From a production point of view, the satisfaction of consumers must be ensured by offering high quality products, including both organoleptic and nutritional value. In this regard, an elucidation of the metabolite profile of the product is essential. Metabolomics seeks to identify and quantify the complete set of metabolites in a cell or tissue type, and to do so as quickly as possible and without bias (Weckwerth, 2003). To achieve this objective, NMR spectroscopy is a quantitative nondestructive, noninvasive, nonequilibrium perturbing technique that provides detailed information on molecular structures, based on atom-centered nuclear interactions and properties. It allows the detection of a wide range of structurally diverse metabolites simultaneously, providing a metabolic 'snapshot' at a particular time point (Beckonert et al., 2007). Generally, NMR spectroscopy has been used in the elucidation of the chemical compounds in solution, but in recent years its application in the field of food, together with *Metabolomics*, has opened new perspectives, allowing changing and increasing the targets in the study of food samples (Laghi, Picone, & Capozzi, 2014).

Newly, NMR analysis has been employed to obtain metabolic profiles of meat samples and to investigate different factors affecting meat properties including the geographical origin of beef (Jung et al., 2010), the muscle type according to bull breed (Ritota, Casciani, Failla, & Valentini, 2015), the effects of different irradiation doses on

* Corresponding author.

E-mail address: HanneC.Bertram@food.au.dk (H.C. Bertram).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.150>

Received 5 April 2017; Received in revised form 24 July 2017; Accepted 27 July 2017

Available online 29 July 2017

0308-8146/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the beef metabolome (Zanardi et al., 2015), the wooden breast abnormality in chicken (Sundekilde, Rasmussen, Young, & Bertram, 2017) and the evaluation of beef exudates as suitable matrix to study beef ageing (Castejón, García-Segura, Escudero, Herrera, & Cambero, 2015). However, few NMR spectroscopic studies focused on the examination of fermented sausages have been conducted. Siciliano et al., 2013 determined the variations in the fatty acid composition based on analyses of lipid extracts and Mati, Staruch, & Soral, 2015 studied the quantitative changes in carnosine and free amino acids in the aqueous fraction during ripening. Consequently, studies on the application of NMR-based metabolomics for the detection of compounds in dry-fermented meat are still limited and no detailed investigations on the complete profiling of intact sausages have been reported. Therefore, the aim of this study was to investigate the potential of a ^1H HR-MAS methodology for an explorative and untargeted elucidation of changes in the metabolites of dry fermented sausages *salchichón* type during a traditional manufacturing process and to explore the ability of this technique to monitor and predict the early days of ripening.

2. Materials and methods

2.1. Dry fermented sausages manufacture

Traditional dry fermented sausages *salchichón* type were produced using a basis of pork (*Longissimus lumborum*) and 20% of fat (w/w). The following non-meat ingredients were also added to this basis to get the final features of the product: sodium chloride (2.5% w/w), lactose (1.0% w/w), dextrose (0.8% w/w), dextrine (1.8% w/w), sodium glutamate (0.25% w/w), sodium ascorbate (0.046% w/w), NO_2 (0.0065% w/w), NO_3 (0.0085% w/w) and black pepper (0.14% w/w). In order to study the spontaneous fermentation process, no starter cultures were added to the meat batter. A fine chopping of meat and fat was carried out at cooled temperature, then the remaining ingredients were added and the final mixture was refrigerated for 24 h to facilitate interactions between its components. Fifty mm collagen casings were stuffed with 400–500 g emulsion, which resulted in sausages with a length of 20 cm. The units were fermented and dried for a period of 14 days, under controlled conditions of temperature, relative humidity and air flow. During the first 24 h sausages were kept at 22 °C and relative humidity of 95%. Within 48 h, storage conditions were reduced gradually to 89% and 17 °C. Hereafter, units were stored at 12 °C for the rest of the manufacturing time. Air flow was established in 1 m/s. Eighteen independent *salchichón* units were manufactured in total and sampling was carried out at different ripening times: 0 (24 h after batter meat preparation and just before stuffing into casings), 2, 4, 7, 11 and 14 days. Three different units of each ripening time were collected for the analysis.

2.2. Physicochemical analyses

In order to monitor the process and ensure the proper ripening development and behavior of the manufactured products, conventional physicochemical analyses were performed. Water activity (a_w) measurements were carried out at 25 °C using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA). The dry matter (DM) content of the samples was determined by drying the sample at 110 °C to constant weight and the results were expressed as a percentage (AOAC, 2006). The pH was determined in a homogenate of the sample with distilled water (1:10) (w/v), using a Crison Digit-501 pH meter (Crison Instruments LTD, Barcelona, Spain). Physicochemical parameters were determined in triplicate. The obtained results are provided in Supplementary material, Fig. S1.

2.3. ^1H HR-MAS NMR measurements

Three representative sections originating from three different

sausage units for each ripening time were analyzed. Samples of lean meat were obtained from the inner part of the *salchichón* units. A D_2O solution (15 μL) containing trimethylsilyl 3-propionic acid sodium salt (TSP, 0.1 mM) was added to the 30 μL disposable Kel-F HR-MAS inserts (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) together with the meat tissue sample (10 ± 2 mg). TSP was used as internal chemical shift reference (0.00 ppm). The insert was placed into a 4 mm zirconium rotor. Proton NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 600 spectrometer, operating at a ^1H frequency of 600.13 MHz, equipped with a HR-MAS probe (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). A water-suppressed Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) spin echo sequence [90° -(t- 180° -t) $_n$ -acquisition] (Mannina, Sobolev, & Viel, 2012) was used to eliminate signals from lipids and macromolecules with an effective echo time of 300 ms. This effective echo time was previously optimized in our laboratory (Lamichhane et al., 2015). Proton spectra were acquired at 4 °C with a spin rate of 5 kHz. Two hundred and fifty-six scans over a spectral region of 10 kHz were collected into 32k data points with a relaxation delay of 5 s. The free induction decay (FIDs) obtained were multiplied by an exponential weight function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz before Fourier transformation. The spectra were phased, baseline-corrected and referenced to TSP using the Bruker Topspin software (version 2.1).

2.4. Statistical analysis

One-way ANOVA was performed, using Statgraphics, version 5.1., to determine the effects of ripening time on physicochemical parameters. Bartlett's test was used to examine the null hypothesis that the standard deviations of data were the same. Duncan's test for multiple mean comparisons procedure was used to determine which means are significantly different from others (at 95% of confidence level). The analyses were conducted across six different ripening times and data are presented as mean values and their standard deviation. A simple regression model was also obtained to predict pH values from carnosine chemical shift data.

Multivariate statistical analysis was conducted on NMR data. A total of 18 *salchichón* spectra were subjected to PCA using AMIX software (version 3.9.11, Bruker BioSpin). Prior to the multivariate analyses, each individual spectrum was data reduced over the 9.03–0.76 ppm range by dividing it into spectral regions (buckets) of variable width. These variable widths were chosen to account for the chemical shift variations due to working with non-buffered samples. Regions with spectral artifacts (i.e. unsuppressed water region) were excluded from the bucketing. Therefore, a total of 161 buckets were defined and the integral of each bucket was calculated. The variable buckets used for the multivariate analysis, including their midpoint and their width are provided in Supplementary material, Table S1. In order to account for the variable concentration of each reconstituted sample, its bucket intensities were normalized to the total spectral intensity over the whole spectrum. For the unsupervised PCA analysis a 161×18 matrix was constructed, its rows representing the different *salchichón* samples (cases) and its columns the integrated buckets (variables). These columns were scaled to unit variance prior to PCA calculations, resulting in all the buckets becoming equally important in the final analysis; in short, case clustering, if evidenced, should be explained by differences in the metabolite profile of the cases rather than in their metabolite absolute levels. The number of principal components (PCs) employed for PCA was established as the minimum required to explain 95% of the total variance. Significance analysis of variables (buckets) was based on the procedure of Goodpaster, Romick-Rosendale, & Kennedy, 2010 using a confidence level of 95%.

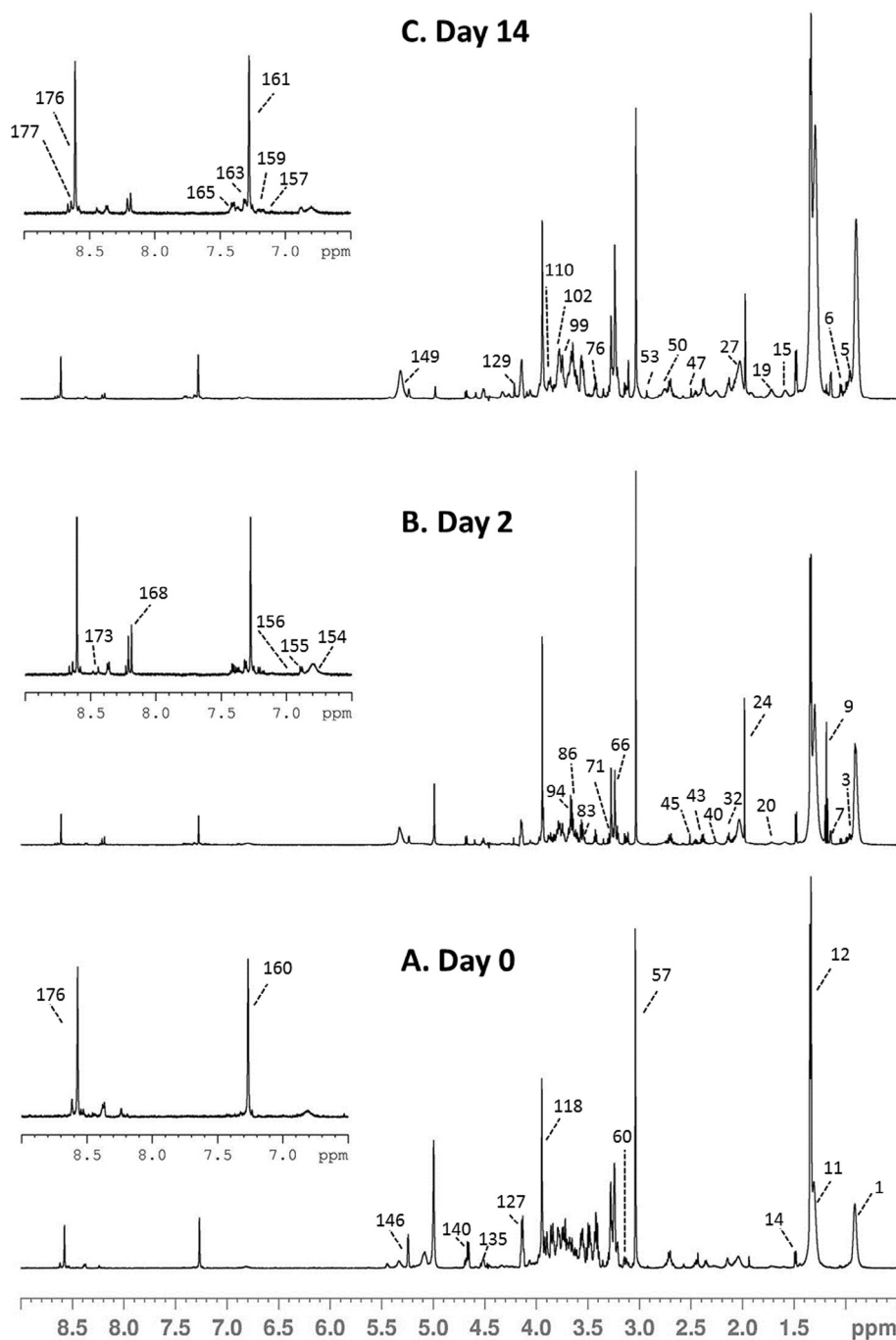


Fig. 1. Representative ^1H NMR spectra of *salchichón* sausages acquired on days 0 (A), 2 (B) and 14 (C) of production. The aromatic region between 6.00 and 9.00 ppm was expanded for better visibility. Assignments for the numbered resonances are given in Table 1.

3. Results and discussion

3.1. ^1H HR-MAS NMR spectra

A comparison of representative one-dimensional ^1H HR-MAS NMR spectra of intact *salchichón* samples collected on days 0 (meat batter), 2 (fermentation stage) and 14 (final product) is shown in Fig. 1. These spectra represent the distinctive stages of the ripening process where the metabolic information shows the greatest differences throughout the process. The spectroscopic changes observed are correlated with the three well-defined periods in the sausages manufacturing process, previously described by conventional analytical methods: formulation, fermentation and drying-ripening (Ordóñez et al., 1999).

Metabolite assignments were based on information previously published by our research group (Castejón et al., 2010, 2015) and on

the databases: HMDB (Human Metabolite Data Base <http://www.hmdb.ca/>) and Chenomx (NMR Suite version 7.6, Edmonton, Canada). The assignment of the main signals present in the ^1H HR-MAS spectra (Fig. 1) is reported in Table 1. Several metabolites were identified: amino acids, peptides and analogues; carbohydrates; organic acids and derivatives; nucleosides, nucleotides and analogues; fatty acids and miscellaneous, including Acetone, Crn, Cho, PCho, GPCho or IMP (abbreviations in Table 1).

From the comparison of the three spectra it is evident that some metabolites experienced a remarkable change during manufacturing. These major spectral differences will be discussed below in further detail.

Table 1 includes the spectral information of each ^1H NMR signal (chemical shift and group, multiplicity and coupling constants) and also its intensity of variation during the fermentative and ripening/drying

Table 1

Chemical shift assignment of ^1H NMR signals for the main components in *salchichón* samples with the peak notation shown in Fig. 1. The table includes the bucket numbers assigned in Table S1, and the magnitude of their variation during fermentation and ripening/drying.

Peak	Compound	Group	$^1\text{H}(\text{ppm})$	Mult.:J(Hz)	Bucket	Variation (fermentation)	Variation (ripening/drying)
1	Fatty Acid (FA)	CH_3	0.88	t	1	↑↑	↑
2	Isoleucine (Ile)	$\delta\text{-CH}_3$	0.96	t	2	↑↑	↑↑↑
3	Leucine (Leu)	$\delta'\text{-CH}_3/\delta'\text{-CH}_3$	0.97	m	2	↑↑	↑↑↑
4	Valine (Val)	$\gamma\text{-CH}_3$	1.00	d:7.05	3	↑↑	↑↑
5	Isoleucine (Ile)	$\gamma\text{-CH}_3$	1.02	d:7.05	4	↑↑	↑↑
6	Valine (Val)	$\gamma'\text{-CH}_3$	1.05	d:7.02	5	↑↑↑	↑↑
7	2,3-Butanediol	CH_3	1.15	d:6.12	7	↑↑↑↑	↑
8	2,3-Butanediol	CH_3'	1.15	d:6.12	7	↑↑↑↑	↑
9	Ethanol (EtOH)	CH_3	1.19	t	8	↑↑↑↑	↓↓↓
10	Isoleucine (Ile)	$\gamma\text{-CH}_2$	1.27	m	9	↑↑↑	↔
11	Fatty Acid (FA)	$(\text{CH}_2)_n$	1.30	–	9	↑↑↑	↔
12	Lactic Acid (LA)	CH_3	1.34	d:6.96	9	↑↑↑	↔
13	Lysine (Lys)	$\gamma\text{-CH}_2$	1.48	m	11	↑↑	↑↑
14	α -Alanine (α -Ala)	$\beta\text{-CH}_3$	1.48	d:7.25	11	↑↑	↑↑
15	Fatty Acid (FA)	$\text{COOH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$	1.57	–	12	↑↑	↑↑
16	Leucine (Leu)	$\beta\text{-CH}_2$	1.69	–	13	↑↑	↑↑
17	Arginine (Arg)	$\gamma\text{-CH}_2$	1.70	–	13	↑↑	↑↑
18	Leucine (Leu)	$\gamma\text{-CH}$	1.72	m	13	↑↑	↑↑
19	Lysine (Lys)	$\delta\text{-CH}_2$	1.72	m	13	↑↑	↑↑
20	Leucine (Leu)	$\beta'\text{-CH}_2$	1.74	m	14	↑↑	↑↑
21	Lysine (Lys)	$\beta\text{-CH}_2$	1.91	–	17	↑↑	↑↑
22	γ -Aminobutyric Acid (GABA)	$\beta\text{-CH}_2$	1.91	m	17	↑↑	↑↑
23	Arginine (Arg)	$\beta\text{-CH}_2$	1.92	–	17	↑↑	↑↑
24	Acetic Acid (AA)	CH_3	1.94	s	18	↑↑↑↑	↓
25	Isoleucine (Ile)	$\beta\text{-CH}$	2.00	m	19	↑↑	↑
26	Proline (Pro)	$\gamma\text{-CH}_2$	2.02	m	19	↑↑	↑
27	Fatty Acid (FA)	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH=CH}$	2.04	–	19	↑↑	↑
28	Glutamate (Glu)	$\beta\text{-CH}_2$	2.06	m	20	↑↑	↑
29	Proline (Pro)	$\beta\text{-CH}_2$	2.07	m	20	↑↑	↑
30	Methionine (Met)	S-CH_3	2.10	s	21	↑↑	↑↑
31	O-Acetylcarnitine (OACart)	$\text{CH}_3\text{-COO}$	2.15	–	22	↑↑	↑
32	Glutamine (Gln)	$\beta,\beta'\text{-CH}_2$	2.15	m	22	↑↑	↑
33	Methionine (Met)	$\beta\text{-CH}_2$	2.16	s	22	↑↑	↑
34	Glutathione (GSH)	$\beta,\beta'\text{-CH}_2$	2.16	m	22	↑↑	↑
35	Acetone	$\text{CH}_3\text{-COO}$	2.22	s	23	↑↑	↑↑
36	Fatty Acid (FA)	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOR}$	2.27	–	23	↑↑	↑↑
37	Valine (Val)	$\beta\text{-CH}$	2.29	m	24	↑↑	↑↑
38	γ -Aminobutyric Acid (GABA)	$\alpha\text{-CH}_2$	2.31	–	24	↑↑	↑↑
39	3-Hydroxybutyric Acid (3-HBA)	$\alpha\text{-CH}_2$	2.31	–	24	↑↑	↑↑
40	Glutamate (Glu)	$\gamma\text{-CH}_2$	2.38	m	25	↑↑	↑↑
41	Succinic Acid (SA)	$\alpha,\beta\text{-CH}_2$	2.42	s	25	↑↑	↑↑
42	3-Hydroxybutyric Acid (3-HBA)	$\alpha'\text{-CH}_2$	2.42	–	25	↑↑	↑↑
43	Carnitine (Cart)	$\alpha\text{-CH}_2$	2.45	m	26	↑	↓
44	Glutamine (Gln)	$\gamma\text{-CH}_2$	2.46	t:6.89	26	↑	↓
45	O-Acetylcarnitine (OACart)	$\alpha\text{-CH}_2$	2.51	m	27	↑↑↑	↓
46	Citric Acid (CA)	$\alpha\text{-CH}_2$	2.54	d:15.44	27	↑↑↑	↓
47	β -Alanine (β -Ala)	$\alpha\text{-CH}_2$	2.57	t	28	↓	↑↑
48	Methionine (Met)	$\gamma\text{-CH}_2$	2.63	–	29	↑↑	↑↑
49	Citric Acid (CA)	$\alpha'\text{-CH}_2$	2.68	d:15.44	29	↑↑	↑↑
50	Carnosine (Car)	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$	2.69	m	29	↑↑	↑↑
51	Anserine (Ans)	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$	2.70	m	29	↑↑	↑↑
52	Fatty Acid (FA)	$\text{CH=CH-CH}_2\text{-CH=}$	2.79	–	32	↑↑	↑↑
53	Trimethylamine (TMA)	N-CH_3	2.91	s	34	↑	↑
54	Glutathione (GSH)	$\text{CH}_2\text{-SH}$	2.97	d	36	↑↑	↑↑
55	γ -Aminobutyric Acid (GABA)	$\gamma\text{-CH}_2$	3.02	t:7.66	37	↑↑	↓↓
56	Lysine (Lys)	$\epsilon\text{-CH}_2$	3.02	m	37	↑↑	↓↓
57	Creatine (Cr) / Phosphocreatine (PCr)	N-CH_3	3.04	s	37	↑↑	↓↓
58	Creatinine (Crn)	N-CH_3	3.06	s	38	↓	↑
59	Anserine (Ans)	$\beta,\beta'\text{-CH}_2$	3.08	m	38	↓	↑
60	Carnosine (Car)	$\beta,\beta'\text{-CH}_2$	3.11	m	39	↑↑	↑↑
61	Phenylalanine (Phe)	$\beta,\beta'\text{-CH}_2$	3.13	m	40	↑	↑
62	β -Alanine (β -Ala)	$\beta\text{-CH}_2$	3.17	t	41	↑	↔
63	Choline (Cho)	$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	3.18	s	42	↔	↑↑
64	Phosphocholine (PCho)	$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	3.21	s	42	↔	↑↑
65	Arginine (Arg)	$\delta\text{-CH}_2$	3.23	–	43	↔	↑
66	Carnosine (Car)	$\text{NH}_2\text{-CH}_2$	3.23	m	43	↔	↑
67	Anserine (Ans)	$\text{NH}_2\text{-CH}_2$	3.23	m	43	↔	↑
68	Carnitine (Cart)	$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	3.24	s	43	↔	↑
69	Carnosine (Car)	$\beta,\beta'\text{-CH}_2$	3.25	m	44	↓↓	↔
70	Anserine (Ans)	$\beta,\beta'\text{-CH}_2$	3.26	m	44	↓↓	↔
71	β -Glucose (β -Glc)	CH-2	3.26	–	44	↓↓	↔
72	Betaine (Bet)	$\text{N}(\text{CH}_3)_3$	3.27	s	45	↔	↔

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Peak	Compound	Group	¹ H(ppm)	Mult.:J(Hz)	Bucket	Variation (fermentation)	Variation (ripening/drying)
73	Taurine (Tau)	N-CH ₂	3.27	t	45	↔	↔
74	Phenylalanine (Phe)	β,β'-CH ₂	3.28	m	46	↓	↔
75	β-Glucose (β-Glc)	CH-4	3.40	—	50	↓↓↓	↔
76	α-Glucose (α-Glc)	CH-4	3.43	—	50	↓↓↓	↔
77	Taurine (Tau)	N-CH ₂	3.43	t:6.74	50	↓↓↓	↔
78	β-Glucose (β-Glc)	CH-5	3.45	—	51	↓↓↓	↔
79	Carnitine (Cart)	γ,γ'-CH ₂	3.45	m	51	↓↓↓	↔
80	β-Galactose (β-Glc)	CH-2	3.48	dd:9.89;7.86	52	↓↓↓	↔
81	β-Glucose (β-Glc)	CH-3	3.49	—	53	↓↓↓	↔
82	Choline (Cho)	CH-1	3.53	—	55	↓	↔
83	α-Glucose (α-Glc)	CH-2	3.54	—	55	↓	↔
84	Glycerol	CH-1	3.57	dd:11.7;6.6	57	↓	↑
85	Threonine (Thr)	α-CH	3.61	—	59	↑	↑
86	Valine (Val)	α-CH	3.62	d	60	↔	↑
87	O-Acetylcarnitine (OACart)	γ-CH ₂	3.62	m	60	↔	↑
88	Phosphocholine (PCho)	β-CH ₂	3.62	—	60	↔	↑
89	2,3-Butanediol	CH	3.63	—	61	↑↑	↔
90	β-Galactose (β-Glc)	CH-3	3.64	dd:9.91;3.50	61	↑↑	↔
91	Ethanol (EtOH)	CH ₂	3.65	—	61	↑↑	↔
92	Glycerol	CH ₂ -OH	3.66	dd:11.7;4.30	62	↑↑	↓
93	Glycerophosphorylcholine (GPCho)	β-CH ₂	3.67	—	62	↑↑	↓
94	Isoleucine (Ile)	α-CH	3.68	d	63	↓	↓
95	2,3-Butanediol	CH'	3.73	—	66	↓	↑
96	α-Glucose (α-Glc)	CH-3	3.72	—	65	↓↓	↔
97	β-Glucose (β-Glc)	CH ₂ -6,6'	3.72	—	65	↓↓	↔
98	Leucine (Leu)	α-CH	3.74	m	66	↓	↑
99	Arginine (Arg)	α-CH	3.76	—	67	↑	↑
100	Lysine (Lys)	α-CH	3.76	m	67	↑	↑
101	Glutamate (Glu)	α-CH	3.77	m	67	↑	↑
102	α-Alanine (α-Ala)	α-CH	3.78	—	68	↓	↔
103	Glutathione (GSH)	CH ₂	3.78	s	68	↓	↔
104	α-Glucose (α-Glc)	CH ₂ -6,6'	3.78	—	68	↓	↔
105	Glycerol	CH-OH	3.79	m	69	↓	↔
106	Glutamine (Gln)	α-CH	3.79	m	69	↓	↔
107	Glutathione (GSH)	α-CH	3.79	m	69	↓	↔
108	α-Galactose (α-Glc)	CH-2	3.82	m	71	↓↓	↓↓
109	α-Glucose (α-Glc)	CH-5	3.84	—	72	↓↓↓	↓
110	α-Glucose (α-Glc)	CH ₂ -6,6'	3.85	—	73	↓↓↓	↔
111	Inosine (Ino)	CH-5 (Rib)	3.85	m	73	↓↓↓	↔
112	Methionine (Met)	α-CH	3.87	—	75	↔	↑
113	Anserine (Ans)	N-CH ₃	3.87	s	75	↔	↑
114	β-Glucose (β-Glc)	CH ₂ -6,6'	3.90	—	77	↓↓↓	↔
115	O-Acetylcarnitine (OACart)	γ-CH ₂	3.90	m	77	↓↓↓	↔
116	β-Galactose (β-Glc)	CH-4	3.92	d:3.07	78	↓	↔
117	α-Mannose (α-Man)	CH-2	3.94	—	79	↑	↓
118	Creatine (Cr) / Phosphocreatine (PCr)	α-CH ₂	3.94	s	79	↑	↓
119	α-Galactose (α-Glc)	CH-4	3.98	d:2.66	81	↓↓	↑
120	Phenylalanine (Phe)	α-CH	3.99	m	82	↓↓	↑
121	β-Ribofuranose	CH-2	4.00	m	82	↓↓	↑
122	3-Hydroxybutyric Acid (3-HBA)	β-CH	4.00	—	82	↓↓	↑
123	Creatinine (Crm)	CH ₂	4.01	s	82	↓↓	↑
124	Inosine 5'-phosphate (IMP)	CH ₂	4.02	m	83	↓	↔
125	Choline (Cho)	α-CH ₂	4.05	—	84	↔	↑
126	β-Galactose (β-Glc)	CH-1	4.07	t:5.98	86	↓↓	↑↑
127	Lactic Acid (LA)	α-CH	4.13	q:6.94	88	↑	↓
128	Phosphocholine (PCho)	α-CH ₂	4.19	t	89	↑↑	↑↑↑
129	Threonine (Thr)	β-CH	4.26	—	91	↔	↑↑
130	Inosine (Ino)	CH-4 (Rib)	4.28	m	92	↑	↑↑
131	Glycerophosphorylcholine (GPCho)	α-CH ₂	4.34	t	93	↑	↑↑
132	Inosine 5'-phosphate (IMP)	CH-4 (Rib)	4.36	m	94	↑	↑↑
133	Inosine (Ino)	CH-3 (Rib)	4.44	m	94	↑	↑↑
134	Inosine 5'-phosphate (IMP)	CH-3 (Rib)	4.51	m	95	↔	↔
135	Carnosine (Car)	CH-COOH	4.52	m	95	↔	↔
136	Anserine (Ans)	CH-COOH	4.53	m	95	↔	↔
137	Histidine (His)	CH	4.58	—	97	↑↑	↔
138	Glutathione (GSH)	CH	4.58	m	97	↑↑	↔
139	Carnitine (Cart)	β-CH	4.59	m	97	↑↑	↔
140	β-Glucose (β-Glc) (Lactose)	CH-1	4.66	d:7.92	99	↓↓↓	↓
141	β-Glucose (β-Glc)	CH-1	4.68	d:7.92	99	↓↓↓	↓
142	Inosine 5'-phosphate (IMP)	CH-2 (Rib)	4.77	m	100	↓↓	—
143	Inosine (Ino)	CH-2 (Rib)	4.79	m	100	↓↓	—
144	α-Glucose (α-Glc) (Dextrin)	CH	5.08	—	103	↓↓	↓
145	α-Mannose (α-Man)	CH-1	5.18	d:3.95	104	↓↓	↓↓
146	α-Glucose (α-Glc)	CH-1	5.24	d:3.70	105	↓↓	↓↓

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Peak	Compound	Group	¹ H(ppm)	Mult.:J(Hz)	Bucket	Variation (fermentation)	Variation (ripening/drying)
147	α-Galactose (α-Glc)	CH-1	5.26	d:3.66	105	↓↓	↓↓
148	β-Ribofuranose	CH-1	5.26	d	105	↓↓	↓↓
149	Fatty Acid (FA)	CH = CH	5.33	–	106	↑↑	↑
150	α-Glucose (α-Glc) (<i>Dextrin</i>)	CH	5.44	–	107	↓↓	↔
151	Inosine (Ino)	CH-1 (Rib)	6.11	d	111	↓	–
152	Inosine 5'-phosphate (IMP)	CH-1 (Rib)	6.16	d	112	↓	–
153	Fumaric Acid (FuA)	α,β CH = CH	6.53	s	115	↓	↑↑
154	Tyramine (Tyrm)	CH-3,5	6.80	m	119	↑↑	↔
155	Tyrosine (Tyr)	CH-3,5	6.89	d:8.16	120	↑↑	↑↑
156	Tyramine (Tyrm)	CH-2,6	7.12	m	122	↑↑↑	↔
157	Tyrosine (Tyr)	CH-2,6	7.19	d:8.16	124	↑↑↑	↑
158	Tryptophan (Trp)	CH-6	7.19	–	124	↑↑↑	↑
159	Carnosine (Car)	CH-5 (His)	7.27	s	126	↑	↔
160	Anserine (Ans)	CH-5 (His)	7.27	s	126	↑	↔
161	Tryptophan (Trp)	CH-5	7.27	–	126	↑	↔
162	Tryptophan (Trp)	CH	7.30	s	127	↑↑↑	↑↑
163	Phenylalanine (Phe)	CH-2,6	7.32	m	127	↑↑↑	↑↑
164	Phenylalanine (Phe)	CH-4	7.38	m	129	↑↑↑	↑↑
165	Phenylalanine (Phe)	CH-3,5	7.42	m	130	↑↑↑	↑↑
166	Tryptophan (Trp)	CH-7	7.53	–	132	↔	↑↑
167	Tryptophan (Trp)	CH-4	7.73	–	134	↑	↔
168	Hypoxanthine (Hx)	CH-8	8.19	s	142	↑↑↑↑	↓
169	Hypoxanthine (Hx)	CH-2	8.21	s	142	↑↑↑↑	↓
170	Inosine 5'-phosphate (IMP)	CH-8	8.25	s	143	↓	–
171	Inosine (Ino)	CH-8 (Purin)	8.24	s	143	↓	–
172	AMP	CH-8	8.25	s	143	↓	–
173	Formic Acid (FoA)	CH	8.46	s	147	↑↑	↔
174	AMP	CH-2	8.49	s	149	↓	–
175	Inosine 5'-phosphate (IMP)	CH-2	8.51	s	149	↓	–
176	Carnosine (Car)	CH-2 (His)	8.59	s	152	↑↑↑	↔
177	Anserine (Ans)	CH-2 (His)	8.63	s	153	↑↑↑	↑↑

The intensity of the quantitative variation of each bucket is represented as follows:

↑: buckets which experienced ≤25% of variation within the indicated period.

↑↑: buckets which experienced 25–50% of variation within the indicated period.

↑↑↑: buckets which experienced 75–100% of variation within the indicated period.

↑↑↑↑: buckets which experienced ≥100% of variation within the indicated period.

–: Not detected compound.

processes. The magnitude of the variation experienced by metabolites during fermentation and ripening (Table 1) is based on the integration of the buckets previously defined in Table S1. In some instances, one single bucket region contained contribution from more than one metabolite, and therefore quantifying the level of a singular metabolite in *salchichón* samples was a difficult task because of spectral crowding and spectral overlap and great care is required with integration quantification approaches. Moreover, it must be noted that chemical shifts are highly sensitive to environmental changes. In particular, changes in pH between samples will alter the ionization of the functional groups and thus affect the final chemical shift of some hydrogen nucleus (Dona et al., 2016). Indeed, AA and SA resonances (in Table 1, signal 24 and 41, respectively) were visibly affected by the decrease in pH between day 0 and 2 (see Fig. S1), since an obvious shift from their usual spectral positions was observed.

Despite the CPMG pulse sequence employed to attenuate contribution from high molecular weight metabolites, it was possible to detect signals corresponding to FAs, however, signals from triglycerides that have a very short relaxation time, were completely removed from the ¹H spectrum. The lipid profile obtained in this study was expected for fermented sausages (Siciliano et al., 2013). Table 1 contains data of the characteristics signals of saturated fatty chains (signals 1, 11, 15, 36), monounsaturated fatty chains (signals 27, 149) and polyunsaturated chains (signal 52). Moreover, signals from phospholipids, PCho (signals 64, 88, 128) and GPCho (signals 93, 131), could be observed.

In table Table 1, it is possible to identify some lack of agreement between the quantitative fluctuations experienced by the different chemical shifts for the same metabolite. In this regard, it should be noted the spectral region 3.25 to 5.50 ppm contains several resonances

from carbohydrates but this spectral region also contains resonances of other metabolites, such as amino acids, and quantitative changes in amino acids signals are subjected to the variation of sugars and their real variation is not revealed. The same would apply to lipid signals, as resonances from fatty acids may hide the real variation of adjacent metabolites. Spectral crowding together with the pronounced decrease in pH during the fermentation stage (Fig. S1) are responsible for the mentioned inconsistencies. Conclusions concerning the increase or decrease of a singular metabolite have been made considering specific buckets in which the relevant metabolite is hardly overlapped or slightly influenced by the presence of other metabolites.

The main metabolites that define the spectral fingerprint of each manufacturing stage are described below.

3.1.1. Formulation stage profile

The representative ¹H NMR spectra of *salchichón* at 0 day (Fig. 1A) appeared to be very similar to that obtained recently for raw beef meat (Castejón et al., 2015), reflecting that at this stage the unripened matrix made from lean meat, fat and non-meat ingredients to a great extent influences the overall metabolite composition. At first glance, the spectra of *salchichón* were dominated by the intense resonances of lactic acid (LA) (signals 12, 127), creatine/phosphocreatine (Cr/PCr) (signals 57, 118) and carnosine (Car) (signals 50, 60, 66, 69, 135, 159, 176). The signals of fatty acids are also noticeable in the spectra of day 0, since fat is one of the main component of sausages, representing 20% of the total composition in the present study.

Some of the additives used in the elaboration of the *salchichón* are in concentration range to be observed in the ¹H spectrum, especially in the carbohydrate region. This spectral part showed remarkable differences

when comparing raw and processed meats (data not shown) due to the fact that dextrose, dextrin and lactose were intentionally added to the minced meat in order to improve microorganism growth. Dextrose is the D-isomer for glucose (D-glucose) and glucose signals in the ^1H NMR spectrum were considerably more prominent in sausage samples than in raw meat. On the other hand, dextrans which are polymers of D-glucose, contain singular anomeric signals in the ^1H NMR spectra (signals 144, 150) that are not present in raw meat (Castejón et al., 2015; Rodríguez et al., 2010). Finally, lactose was detectable through the resonances of their constituent monosaccharides, glucose and galactose.

3.1.2. Fermentation stage profile

As shown in Fig. 1B, the ^1H NMR signals corresponding to amino acids, carbohydrates and organic acids experienced notable changes compared with the previous stage and the most striking finding was the pronounced increase in EtOH (signal 9), AA (signal 24) and 2,3-butanediol (signals 7, 8, 89). Variation in these metabolites can be explained by the intense microbial activity during the first 48 h of the process as a result of the LAB anaerobic fermentative metabolism and the microbial enzymatic activity related to the onset of proteolysis (Aymerich, Martín, Garriga, & Hugas, 2003). Related to this microbial activity, a pronounced decrease in the signals assigned to α -Glc, β -Glc, α -Gal and β -Gal in day 2 was also observed, as carbohydrates serve as energy substrate for LAB.

Fig. 2 shows the variation of the integral values (arbitrary units) of the mentioned metabolites during processing. In Fig. 2A, the

degradation of α -Glc and β -Glc as a result of microbial consumption is revealed and significant differences between days 0 and 2 ($P < 0.05$) were observed. On the contrary, the remaining metabolites, EtOH, LA, AA, FoA and 2,3-butanediol, (Fig. 2B–F) exhibited a different behavior with a strongly and significant ($P < 0.05$) increase during the first 48 h, thus they are byproducts resulting from fermentative metabolism. There are also significant changes ($P < 0.05$) throughout the ripening process (2–14 days) in EtOH, LA and AA. These metabolites, clearly linked to fermentation, decreased noticeably as ripening proceeded. On the other hand, Glc, FoA and 2,3-butanediol remained relatively stable (non-significant differences) during the subsequent production days.

Regarding amino acids, Ile, Leu, Val, α -Ala, Lys, Arg, Met and Glu were increased during the fermentation stage, as well as the aromatic amino acids signals intensities (Phe, Tyr, Trp and Tyrm). Moreover, notable changes in nucleotides during the first 48 h of the process were also detected, as well as changes in purine derivatives. While, AMP, IMP and Ino underwent a significant decrease, Hx was notably increased at this stage. These changes are consistent with the degradation process of ATP in muscle, according to which: $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{AMP} \rightarrow \text{IMP} \rightarrow \text{Ino} \rightarrow \text{Hx} \rightarrow \text{Xa} \rightarrow \text{uric acid}$.

3.1.3. Final product profile

Fig. 1C shows the representative ^1H HR-MAS NMR spectra of a *salchichón* type product after 14 days of ripening. The analysis of the metabolite profile revealed a decrease or even an almost complete extinction of these compounds linked to the fermentative metabolism in

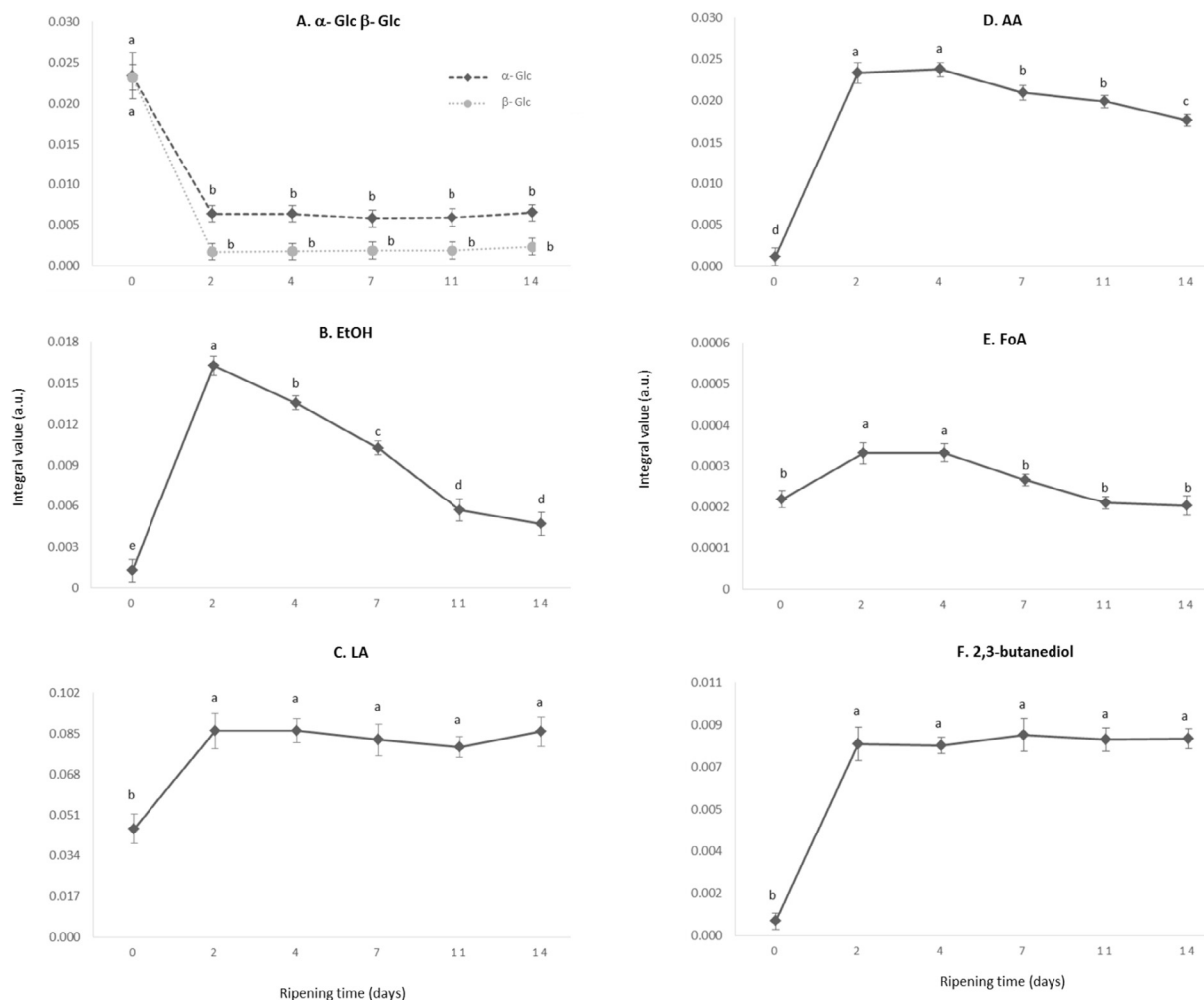


Fig. 2. Changes in representative metabolites integral (mean values and standard deviation) during *salchichón* manufacturing (days 0, 2, 4, 7, 11, and 14). A: α -Glc; β -Glc. B: EtOH. C: LA, D: AA, E: FoA, F: 2,3-butanediol.

the previous stage, mainly carbohydrates. As previously described, spectral signals of EtOH and AA were significantly reduced.

Nevertheless, the signs of proteolysis were more evident at this time point reflected in the increase observed in the signals assigned to Ile, Leu, Val, α -Ala, Glu, Gln, Met, Thr, Phe, Tyr and Trp. These free amino acids will contribute prominently to the sensory characteristics of the product, since they are highly correlated with flavor development in cured products (Díaz, Fernández, García de Fernando, de la Hoz, & Ordóñez, 1997).

The nucleoside degradation initiated during the fermentation stage also continues during ripening/drying. Indeed, IMP (signals 142, 152, 170, 175), Ino (signals 143, 151, 171) and AMP (signals 172, 174) are present in very low concentration and the integration/quantification of these signals is almost impossible for being very close to the baseline and noise level. Similar changes in purine derivatives have previously been detected in salmon (Castejón et al., 2010) and beef samples (Castejón et al., 2015).

A quantitative variation in lipid compounds was detected during the process and a slight increase in the release of free FAs during fermentation stage and at the end of ripening was revealed from the integration of the lipid signals detected throughout manufacturing. The relative proportions of FAs signals compared to other metabolites from the spectrum changed during maturation, and the increase in the relative intensities of the FAs signals was revealed as ripening proceeded, a phenomenon favored by the concentration of solutes by progressive dehydration of samples. To illustrate this fact, FA:Cr/PCr ratio was calculated for day 0 (0.97), day 2 (1.40) and day 14 (7.02). To be able to do that, the concentration of Cr/PCr was considered constant during the ripening process.

In addition, by inspection of the spectral data, it was possible to predict the sample pH value. The pH-dependent ^1H chemical shift (δ) of the aromatic histidine signals from Car allowed to develop a fitting model. A statistically significant relationship ($P < 0.05$) between pH and δ Car was observed and a simple regression model was obtained to predict the pH value from δ Car. The adjusted model equation was: $\text{pH} = 29.55 - 18.40 \cdot \Delta\delta \text{ Car}$ ($R^2 = 89\%$), where $\Delta\delta \text{ Car}$ is the chemical shift difference between the two aromatic protons from Car, reference chemical shifts located at 7.27 and 8.59 ppm, values referred to day 0 samples. The obtained correlation coefficient (-0.94) revealed a strong relationship among the considered variables. This finding constitutes an interesting approach to study changes in meat pH directly from the spectral information.

3.2. Monitoring the ripening process by PCA

The significant differences in metabolite concentrations provide the basis for a hypothesis on the underlying causes for the observed segregation of the groups. The possibility to monitor the different stages of production through the changes observed in the spectra was confirmed by applying an unsupervised multivariate analysis method, PCA. The whole data set of bucket-reduced ^1H NMR spectra (columns) for 18 *salchichón* samples (rows) was analyzed. Fig. 3 shows the scatter plot of PC1 vs PC3. PC1 and PC3 explain 40.76% and 10.59% of the total variance, respectively. A clear discrimination between samples of different ripening time was revealed. PC1 allowed the spectra to be separated according to the fermentation stage, being possible to distinguish the onset of fermentation and the discrimination between raw and ripened samples, while PC3 classified the samples according to their ripening time. Moreover, this multivariate analysis suggests that the total spectra contain useful information for sample classification and to monitor and predict the maturation degree of the sausages analyzed.

In order to illustrate the changes during fermentation and ripening/drying considered above, Fig. 4 shows the representative profiling of *salchichón* samples for fermentation stage (Fig. 4A) and drying/ripening (Fig. 4B) on the basis of the most characteristic buckets of each stage. In

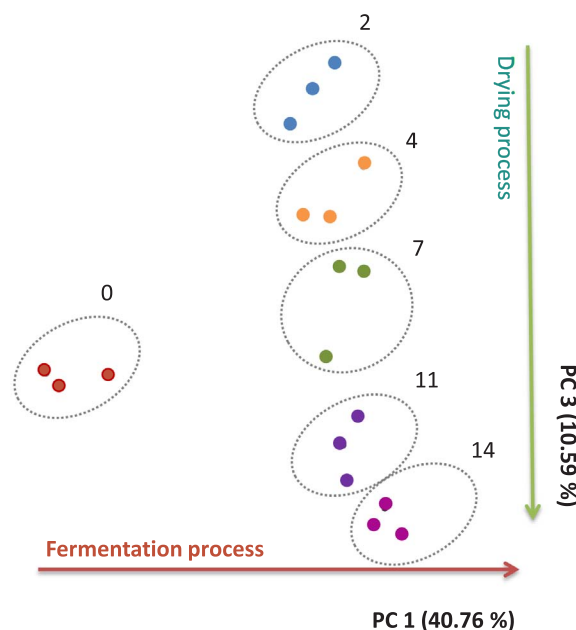


Fig. 3. Principal component analysis (PCA) of *salchichón* samples. Scores plot of PC1 vs PC3 is shown. Each data point corresponds to one single sample. Separation was achieved according to the ripening time (0, 2, 4, 7, 11, 14 days). The two main stages of production are reflected: PC1 represents the initiation of fermentation and PC3 reflects the progress of drying.

these histograms the quantitative variation of the bucket for each stage regarding the total variation is represented and it allows to easily define metabolic spectral variations occurring during the manufacturing process described in this study. In addition, as a result of the foregoing, the application of the NMR-based metabolomics allowed to identify the compounds and the changes that the sausages *salchichón* type underwent during the ripening process.

4. Conclusions

To the best of our knowledge, this study is the first to report the changes in the complete metabolic profile of intact dry-fermented sausages *salchichón* type during ripening by means of ^1H HR-MAS NMR spectroscopy. The study revealed that NMR is a powerful tool to examine intact sausages and to obtain complementary information, since it allowed the identification and the quantitation of the main *salchichón* metabolites. The applied ^1H HR-MAS NMR methodology has been found to be a rapid and effective technique to monitor the changes associated with the fermentation and drying-curing processes. PCA of the ^1H NMR spectra of *salchichón* allowed to monitor the fermentation process (PC1) and to classify the samples according to their ripening time (PC3). Consequently, ^1H HR-MAS NMR spectral profiles of dry-fermented products can be very useful in evaluating the metabolome variations as a function of different sausage processing conditions.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support of project AGL2010-19158 funded by the Spanish Secretary of State of Research, Development and Innovation within the Ministry of Economy and Competitiveness.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.150>.

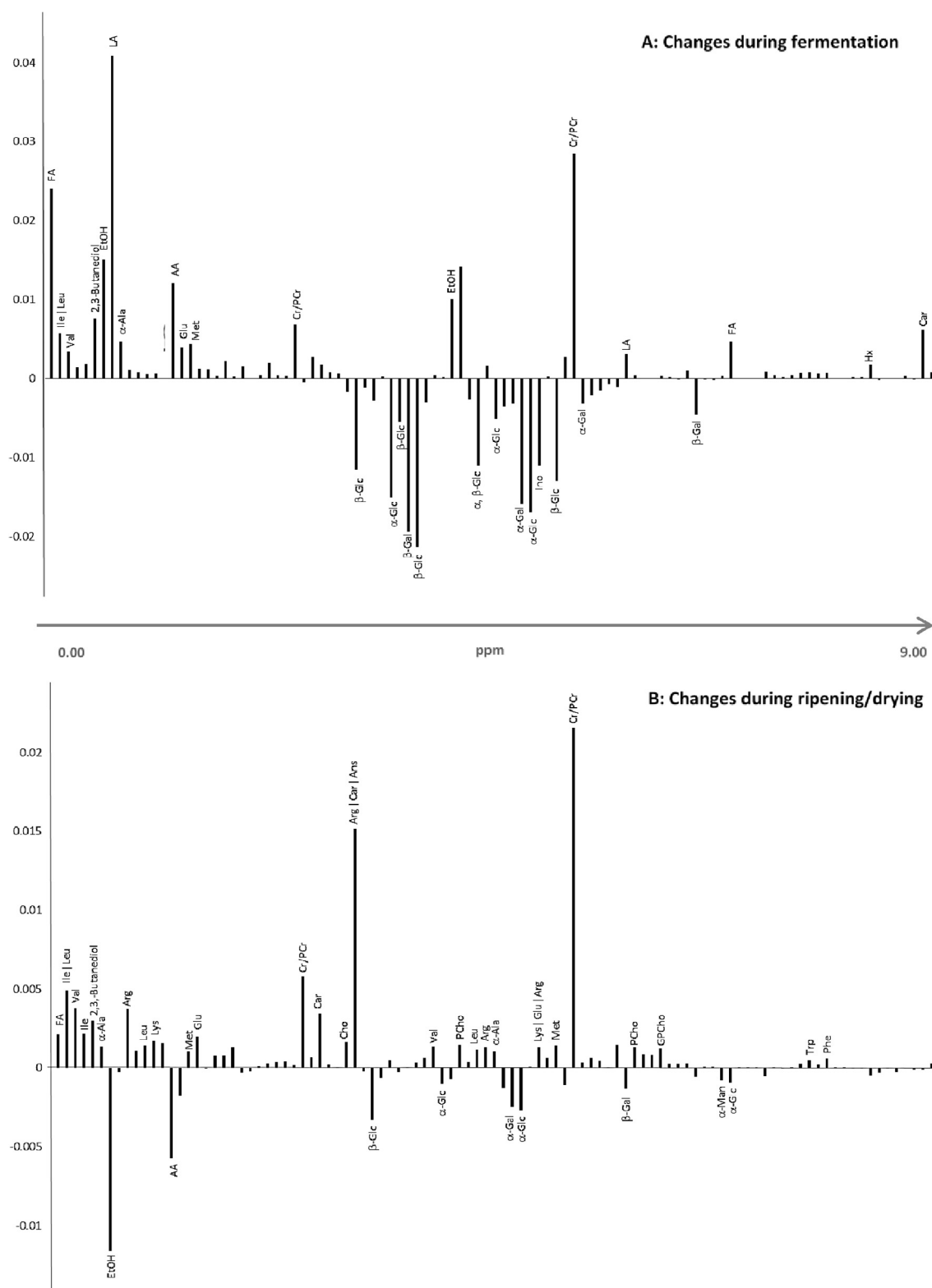
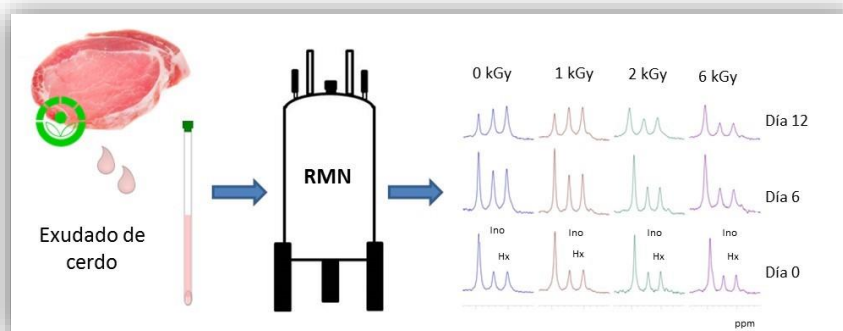


Fig. 4. Plot of the buckets which experienced notable changes A: during fermentation and B: during ripening/drying. The variation of the integral of each bucket (A: 0–2 days and B: 0–14 days) compared to the final value of the bucket of each stage is represented.

References

- Association of Official Agricultural Chemists (2006). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists* 1st rev. (18th ed.). Gaithersburg, USA: AOAC Int.
- Aymerich, M. T., Martín, B., Garriga, M., & Hugas, M. (2003). Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nosnpathogenicStaphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 4583–4594.
- Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M. D., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C., et al. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*, 2, 2692–2703.
- Castejón, D., García-Segura, J. M., Escudero, R., Herrera, A., & Cambero, M. I. (2015). Metabolomics of meat exudate: Its potential to evaluate beef meat conservation and aging. *Analytical Chemical Acta*, 901, 1–11.

- Castejón, D., Villa, P., Calvo, M. M., Santa-María, G., Herraiz, M., & Herrera, A. (2010). ^1H -HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48, 693–703.
- Díaz, O., Fernández, M., García de Fernando, D. G., de la Hoz, L., & Ordóñez, J. A. (1997). Proteolysis in dry fermented sausages: The effect of selected exogenous proteases. *Meat Science*, 46, 115–128.
- Dona, A. C., Kyriakides, M., Scott, F., Shephard, E. A., Varshavi, D., Veselkov, K., et al. (2016). A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabolomics/metabolomics experiments. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, 135–153.
- Fernández, M., Ordóñez, J. A., Bruna, J. M., Herranz, B., & de la Hoz, L. (2000). Accelerated ripening of dry fermented sausages. *Food Science and Technology*, 11, 201–209.
- Fernández-López, J., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., Navarro, C., & Pérez-Álvarez, J. A. (2008). Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichón” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science*, 80, 410–417.
- Goodpaster, A. M., Romick-Rosendale, L. E., & Kennedy, M. A. (2010). Statistical significance analysis of nuclear magnetic resonance-based metabolomics data. *Analytical Biochemistry*, 401, 134–143.
- Jung, Y., Lee, J., Kwon, J., Lee, K. S., Ryu, D. H., & Huang, G. S. (2010). Discrimination of the Geographical Origin of Beef by ^1H NMR-Based Metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10458–10466.
- Laghi, L., Picone, G., & Capozzi, F. (2014). Nuclear magnetic resonance for foodomics beyond Food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 59, 93–102.
- Lamichhane, S., Yde, C. C., Mielby, L. H., Kidmose, U., Møller, J. R., Hammershøj, M., et al. (2015). High-resolution magic angle spinning studies of semi-hard Danbo (30+) cheese-impact of processing condition and relation to sensory perception. *Magnetic resonance in food science. defining food by magnetic resonance*<http://dx.doi.org/10.1039/9781782622741-00171> pp. 171–180.
- Mannina, L., Sobolev, A. P., & Viel, S. (2012). Liquid state ^1H high field NMR in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 66, 1–39.
- Mati, M., Staruch, L., & Soral, M. (2015). Use of NMR spectroscopy in the analysis of carnosine and free amino acids in fermented sausages during ripening. *Chemical Papers*, 69, 1319–1324.
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 329–367.
- Ritota, M., Casciani, L., Failla, S., & Valentini, M. (2015). HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis meat characterization. *Meat Science*, 92, 754–761.
- Rodrigues, J. E. A., Erny, G. L., Barros, A. S., Esteves, V. L., Brandao, T., Ferreira, A. A., et al. (2010). Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods. *Analytica Chimica Acta*, 674, 166–175.
- Siciliano, C., Belsito, E., De Marco, R., Di Gioia, M. L., Leggio, A., & Liguori, A. (2013). Quantitative determination of fatty acid chain composition in pork meat products by high resolution ^1H NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, 136 564–554.
- Sundekilde, U. K., Rasmussen, M. K., Young, J. F., & Bertram, H. C. (2017). High resolution magic angle spinning NMR spectroscopy reveals that pectoralis muscle dystrophy in chicken is associated with reduced muscle content of anserine and carnosine. *Food Chem.* 217, 151–154. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.104>.
- Weckwerth, W. (2003). Metabolomics in systems biology. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 669–689.
- Zanardi, E., Caligiani, A., Palla, L., Mariani, M., Ghidini, S., Di Ciccio, P. A., et al. (2015). Metabolic profiling by ^1H NMR of ground beef irradiated at different irradiation doses. *Meat Science*, 103, 83–89.



Trabajo 7

Valoración de los exudados de cerdo como matriz apta para la monitorización de la conservación de la carne tratada con electrones acelerados

Enviado a *Food Research International*

Los exudados cárnicos constituyen un subproducto de deshecho procedente de la carne fresca de manera natural e inevitable. Son fáciles de obtener y apenas requieren manipulación previa para su análisis. A pesar de no ser empleados para la nutrición humana, contienen numerosas sustancias que también están presentes en la carne de procedencia y, por tanto, su análisis podría ser interesante para obtener información sobre diversos procesos y tratamientos.

En el **Trabajo 7** se presenta por primera vez el perfil metabólico de los exudados de cerdo obtenido mediante la metodología ^1H RMN HRMAS, que permite obtener gran cantidad de información, tanto cualitativa como cuantitativa de la muestra. Se plantea la posibilidad de emplear los exudados de cerdo como matriz de análisis para identificar los procesos y las transformaciones habituales que tienen lugar durante el almacenamiento de carne sometida a un proceso de conservación mediante la aplicación de electrones acelerados. Tanto la dosis del tratamiento como el tiempo de almacenamiento de las muestras tratadas tienen un efecto notable sobre los metabolitos cárnicos que pueden ser percibidos a partir de los datos espectrales obtenidos. Se identificaron numerosos metabolitos presentes en las muestras de exudados. Además, la aplicación de herramientas quimiométricas al conjunto de datos espectroscópicos puso de manifiesto cuáles fueron los metabolitos que experimentaron variaciones significativas durante el almacenamiento de la carne. El estudio metabolómico realizado hizo posible la clasificación de las muestras de carne de acuerdo a su tiempo de almacenamiento a través del Análisis de Componentes Principales (PCA).

En función de los resultados obtenidos es posible concluir que los perfiles de RMN de los exudados de la carne de cerdo podrían utilizarse para la monitorización de la conservación y almacenamiento de la carne.

Evaluation of E-beam Irradiation and Storage Time in Pork Exudates Using NMR Metabolomics

García-García, A.B. ^a; Herrera, A. ^b; Fernández-Valle, M. E. ^c; Cambero, M.I. ^{a,*}; Castejón, D. ^c

^a) Sección Departamental de Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Spain.

^b) Departamento de Química Orgánica. Facultad de Químicas. Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid. Spain.

^c) Centro de Asistencia a la Investigación de Resonancia Magnética Nuclear y de Espín Electrónico. Universidad Complutense de Madrid. 28040. Madrid. Spain.

* Corresponding author. Tel: +34 913943745; Fax: +34 913943743; E-mail: icambero@vet.ucm.es

Abstract: Seventy-two exudates from pork tenderloin samples, subjected to E-beam irradiation treatments, have been employed to monitor, through ¹H-NMR analysis, the effects of irradiation dose (0, 1, 2 and 6 kGy) and storage time (1, 6 and 12 days). As far as we know, this is the first study where meat exudate is employed to monitor the effects of irradiation dose and storage time. The ¹H-NMR spectra, obtained after ~ 2 minutes, allowed to determine the main components of the pork exudate. Results show that ¹H-NMR-based metabolomics provides valuable information about the metabolic changes suffered during storage and how these transformations could be affected by E-beam irradiation treatment. The ease to obtain exudates, the simple NMR sample preparation, the good correlation between the selected metabolites, the irradiation treatment and the storage times point to that this study could be the first step to develop a new method for analysis and control of meat conservation and to evaluate its irradiation treatment.

Keywords: Exudate, ¹H-NMR, Pork, Meat, Storage, Quality & Safety, Traceability, Irradiation

1. Introduction

Nowadays, quality and safety remains a major concern facing the food industry and it is a critical component in ensuring food and nutrition security worldwide (FAO, 2012). Regarding meat products, quality refers to intrinsic attributes critical for the technological, nutritional and sensory suitability of meat for eating, processing, and storage (Listrat et al., 2016). Therefore, it is imperative to pay close attention to meat quality and safety. These targets are becoming dynamic and challenging concerns which require the generation of new information and continuous reevaluation of the existing knowledge for meeting market's demands (Sofos, 2008). One of the successful techniques to preserve food with minimum interruption to the functional, nutritional, and sensory properties is irradiation (Chauhan et al., 2009). This processing involves controlled application of energy from ionizing radiations such as gamma rays, X-rays, and electron beam for food preservation. Irradiation preserves the food by disrupting the biological processes that lead to decay of food quality (Farkas, 2006). Radiation interacts with water and other biological molecules in a food system and produces various radiolytic products, which generally act as oxidizing agents and can cause several changes in the molecular structure of organic matter. Radiations also damage DNA molecules effectively, therefore living cells such as in microorganisms, insects, and gametes are prevented from reproduction, resulting in a preservative effect. In contrast, irradiation, like other processing techniques, results in physicochemical changes in food products. The nature and extent of these changes depend on the kind of food subjected to irradiation and the irradiation dose (Chauhan et al., 2009). Recently, a study developed by our group revealed the suitability of electron beam (E-beam) irradiation to increase the shelf life of whole fresh pork loin stored at 4°C (García-Márquez et al., 2012).

In general, the traditional techniques and methods for evaluation and detection of meat quality and safety are tedious, laborious, expensive and time-consuming while spectroscopic techniques have successfully overcome some of these disadvantages and can supplement or replace them. There are growing interests in spectroscopic techniques, such as Nuclear Magnetic Resonance (NMR), due to their high specificity, convenience, non-destructive, non-invasive, cost effective and quick response (Cheng et al., 2013). NMR spectroscopy for structural and compositional characteristics of complex biological samples (Martínez et al., 2005) has frequently been applied in food analysis to a broad range of analytical challenges (Capitani et al., 2012; Rodrigues et al., 2010; Straadt et al., 2014). In studies on meat, NMR has shown a high potential for compositional analysis of muscles (Ritota et al., 2012; Sundekilde et al., 2017), storage (Castejón et al., 2015), geographical origin (Jung et al., 2010), quality (Bertram, 2017) or fatty acids profiling (Sicialiano et al., 2013). Traditionally the high-resolution NMR sampling of biological tissue starts with an extraction procedure followed by a conventional liquid NMR spectroscopy acquisition (Mannina et al., 2012). However, magic angle spinning (MAS-)NMR allowed measuring directly on a few milligrams of intact tissue making the extraction procedure unnecessary and thus much faster and less resource demanding (Castejón et al., 2010).

In this paper, we present an alternative that consists in the direct study of pork exudate. The loss of exudates from muscle is unavoidable due to some loss of moisture that occurs due to the presence of water in a free form in muscle tissue. Therefore, the exudate is an easy to obtain substrate which manipulation does not mean loss or alteration of the sample from which it comes from. They are valueless, easy-to-obtain and, their presence in small amounts in commercial meat packages cannot be associated with significant degradation or alteration of the meat from which they proceed. Rather than this, they should be considered as the natural juice from raw meat that conveniently analyzed could provide homogeneous information of the whole meat sample. Despite all these advantages, pork exudate has been poorly studied. Recently, the influence of accumulated exudate on the quality characteristics of fresh and freeze-thawed pork during cold storage was considered (Kim et al., 2013). Moreover, in order to assure meat processing and final meat quality, identification of proteins (Pioselli et al., 2011) and fatty acids (Benet et al., 2015) in cooked ham exudates was conducted. NMR spectra of complex mixtures show hundreds of signals, coming from a great number of diverse metabolites. This fact and the overlap between signals, sometimes, make it difficult to extract information, either “visually” or by simple processing of the data. The most effective way to analyse these “holistic profiles” is by using chemometric tools which enable the visualization of the data in a reduced dimension and the classification of the samples into established classes based on inherent patterns in a set of spectral measurements (Alonso-Salces et al., 2007).

Fresh meat is usually commercialized in trays, vacuum packed with or without modified atmosphere packaging (MAP). Therefore, exudates naturally extracted from meat are accumulated and contained inside these packaging. The objective of the present work is to determine if, under the commercial conditions mentioned, meat exudates can be considered a suitable matrix to study the metabolic changes that occur in the meat during the storage and conservation, as well as during the application of an irradiation treatment. This statement is based in a previous work (Castejón et al., 2015) that verifies that exudates extracted from beef provide important metabolic information of the meat piece from which it proceeds due to the strong correlation found between meat NMR spectra and exudates NMR spectra. Thus, ^1H NMR would be a suitable technology for non-destructive analysis allowing the monitoring of different procedures associated with meat processing.

Therefore, the aim of the present work was: i) to evaluate the feasibility of NMR techniques to analyze pork exudates as a new suitable matrix to obtain fresh meat metabolome ii) to identify changes in the molecular profile of pork exudate during storage and iii) to study whether irradiation has a positive effect on the degradation of pork exudates during storage and also, to determine the suitable irradiation doses. According to these objectives, samples under four different irradiation doses (0, 1, 2 and 4 kGy) stored at three different times (1, 6 and 12 days) were analyzed, and the ability of NMR together with chemometric tools to differentiate between irradiated and non-irradiated samples was evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Twenty-four hours postmortem, pork tenderloin pieces (3.5 to 5 kg in weight) were collected from two local butcher markets. Meat samples did not differ in their postmortem period. Thermally insulated containers were employed during transportation of the samples to the laboratory, which, in all cases, took no longer than 1 hour. Afterwards, ~ 50 g pieces of each pork tenderloin sample was vacuum-packed at 20 kPa in 10 x 10 cm laminated film bags (90 μm copolymer of polyamide/polyethylene) of low gas permeability (transmission rates of 35 $\text{cm}^3\ 24\text{h}^{-1}\ \text{m}^{-2}\ \text{bar}^{-1}$ and 150 $\text{cm}^3\ 24\text{h}^{-1}\ \text{m}^{-2}\ \text{bar}^{-1}$ for O_2 and CO_2 , respectively) and stored at 4°C until irradiation treatment, which was performed in the next 12-14 h. To evaluate pork exudates as a suitable matrix to analyze meat metabolites, a preliminary study was conducted to compare both, intact muscle and exudates spectra. Results are shown in Figure S2 (Supplementary information)

2.2. Irradiation Treatments

Seventy-two samples (6 pork x 4 doses x 3 storage times) were transported under refrigeration (2-3 °C) in insulated boxes to the irradiation plant (Ionmed S.A., Tarancón, Cuenca, Spain), and treated under an electron-beam (E-beam) radiation source operating at 10 MeV. The radiation treatment was adjusted to apply doses of 1, 2 and 6 kGy, dose lower than 10 kGy, which is considered the safety dose by the World Health Organization (WHO, 1999). The dose absorbed by the samples was checked by determining the absorbance of cellulose triacetate dosimeters (ASTM, 2000) simultaneously irradiated. Non-treated samples were used as control (0 kGy). After irradiation treatment samples were kept refrigerated at 4 °C.

2.3. Exudates collection

At 1, 6 and 12 days of storage, the released exudate was collected from vacuum-packed samples (twenty-four samples per storage point), frozen at -80 °C, and freeze-dried at room temperature. Freeze-dried exudates were stored at -80 °C until NMR analysis.

2.4. Preparation of samples for NMR analysis

For ^1H -NMR analysis 23.6 ± 0.3 mg of the lyophilized pork tenderloin exudates were reconstituted in an eppendorf by adding 650 μL phosphate buffer solution in D_2O (0.1M; pH=7.0) containing 1 mM sodium trimethylsilyl-2,2,3,3-tetradeuteropropionate (TSP), an internal chemical shift standard. Samples were vortexed for 30 seconds and transferred to 5 mm NMR tube. The pH of the samples was measured after the NMR experiment, pH= 6.57 ± 0.05 .

2.5. NMR Analysis

2.5.1 One-dimensional NMR experiments

^1H -NMR spectra of the reconstituted exudates were recorded randomly at 298K on a Bruker Avance 500MHz spectrometer using a 5-mm multinuclear direct detection broadband probe (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany). 1D NOESY (NOESYPRESAT) standard solvent suppressed sequence was acquired into 32 k data points, averaged over 32 scans. The total acquisition time was 2 min and 23 s, with a relaxation delay of 2 s. A mixing time of 150 ms and a spectral width of 9058 Hz were used. The free induction decays (FIDs) obtained were processed using Bruker Biospin TOPSPIN software (version 2.1). Prior to Fourier transformation, the FIDs were multiplied by an exponential weight function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz. Spectra were phased, baseline-corrected and referenced to the TSP at $\delta = 0$ ppm.

2.5.2 Two-dimensional NMR experiments

Assignments of NMR signals were confirmed through the standard two-dimensional experiments; namely, ^1H , ^1H -COSY, ^1H , ^1H -TOCSY, ^1H , ^{13}C -HSQC, and ^1H , ^{13}C -HMBC. Standard homonuclear COSY and TOCSY experiments with water suppression were acquired with 2k data points in t_2 domain and 384 increments in t_1 , each with 64 scans. A spectral width of 13 ppm for both dimensions was employed. A mixing time of 70 ms was used for TOCSY experiment. The parameters selected for heteronuclear HSQC and HMBC experiments were: 2k data points in t_2 domain and 384 increments in t_1 , each with 256 scan; a spectral width of 13 ppm for f_2 dimension and 260 ppm for f_1 dimension. In addition, short-range and long-range couplings were set to 145 Hz and 10 Hz, respectively. Two-dimensional data sets were enhanced using the technique of forward linear prediction in first dimension on the real data points to 512 and zero filling to 1024 and squared sine bell window functions in both dimensions prior to Fourier transformation.

2.5.3 Spectral assignment

Assignment of resonances in the ^1H -NMR spectra from pork tenderloin exudates was based on previous studies (Castejón et al., 2015). These assignments were confirmed through the information of connectivity between the spins obtained from 2D experiments.

2.6. Statistical analysis

A total of 72 spectra were subjected to multivariate analysis. Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares (PLS) were performed using AMIX software (version 3.9.11, Bruker Biospin) and MetaboAnalyst (Version 3.0, URL: <http://www.metaboanalyst.ca>) (Xia, Sinelnikov, Han, & Wishart, 2015; Xia, & Wishart, 2016). The 1D spectra of pork exudates were data reduced over the shift range of $\delta = 8.94 - 0.50$ ppm into spectral integral regions (buckets) of 0.04 ppm. These constant buckets widths were chosen due to work with buffered exudate samples. Regions with spectral artefacts (i.e.,

unsuppressed water region) were excluded from bucketing. A total of 212 buckets were defined, and the integral of each of them, calculated by summing up the intensities of all its points, was divided by the total number of points in the bucket. PCA and PLS were performed using the data from the bucketed 1D spectra of pork exudates.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of the ^1H -NMR spectrum of pork exudate

In the first part of the work, exudate profiles of the unirradiated samples were evaluated. **Figure 1** shows the comparison between representative ^1H -NMR spectra of exudate samples stored during 1 (A), 6 (B) and 12 (C) days. The chart gives a general overview of the main metabolites present in the spectrum (carnosine, creatine and lactate) and the spectral regions where fundamental nutrients appear.

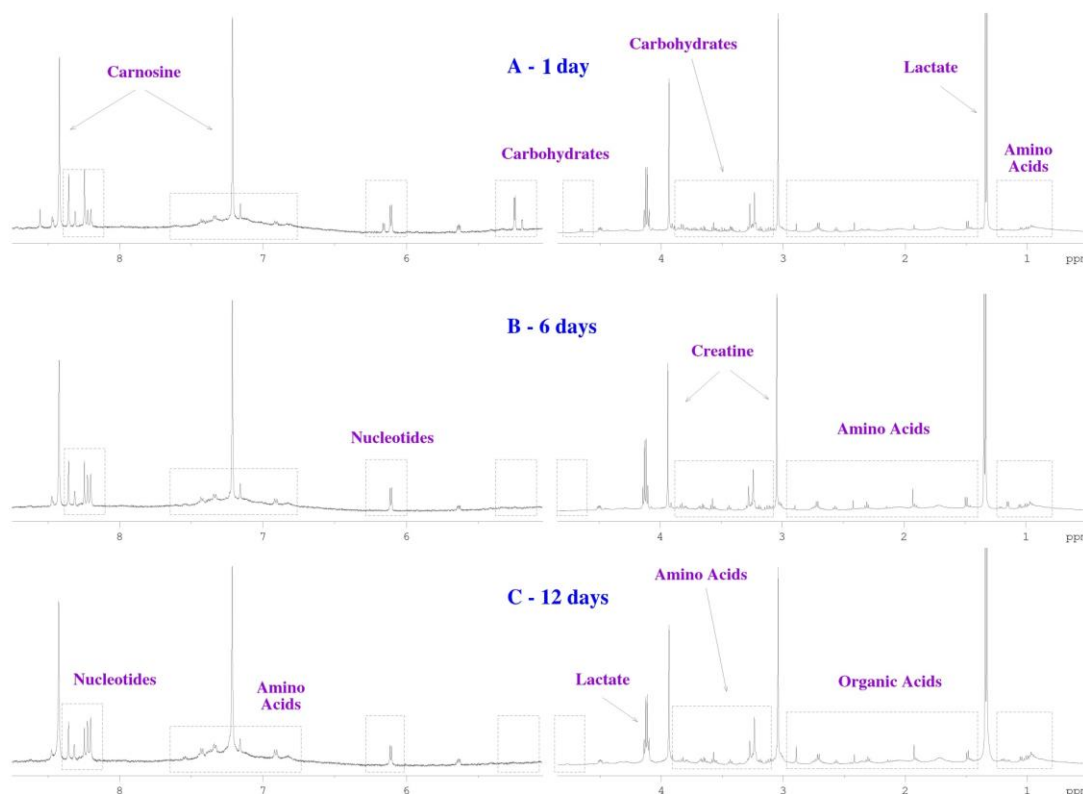


Fig. 1. ^1H -NMR spectrum, obtained after ~ 2 minutes of analysis time in a 500 MHz spectrometer, which enables the determination of the main components of the non-irradiated pork exudates at 1(A), 6(B) and 12(C) days of storage.

As previously mentioned, signal assignments for ^1H -NMR spectra from pork exudates were checked out through the 2D NMR spectra. As a result, it allowed us to confirm that all the metabolites identified in

the pork exudates spectra had been described previously in studies carried out in our laboratory (Castejón et al., 2015). Therefore, our research was focused on, as set forth below, changes in the main metabolites between samples subjected to different storage times and conservation irradiation dose.

At this point, it was noticed that it was possible to extract additional information through the spectral data that allowed to predict samples pH value. The pH-dependent ^1H chemical shift (δ) of the aromatic histidine signals from carnosine showed a statistically significant relationship ($P < 0.05$) between pH value of the sample and its δ . This fact has been recently reported in *salchichón* sausages (García-García et al., 2018). This finding constitutes an interesting approach to study changes in meat pH directly from the spectral information, especially taking into account that pH of muscle tissue is extremely important to meat science since the pH at specific times during the conversion of muscle to meat, as well as the ultimate pH of meat, affects many quality factors (Li et al., 2014).

3.1.2 NMR-based evaluation of the long-term storage

Exudate pork samples were analyzed according to their storage time under an unsupervised dimensionality reduction approach, Principal Component Analysis (PCA). Eighteen samples of 212 buckets each, ranging from 1, 6 and 12 days after the purchase. As a result, 96.1% of the variance was explained by the first six Principal Components (PCs).

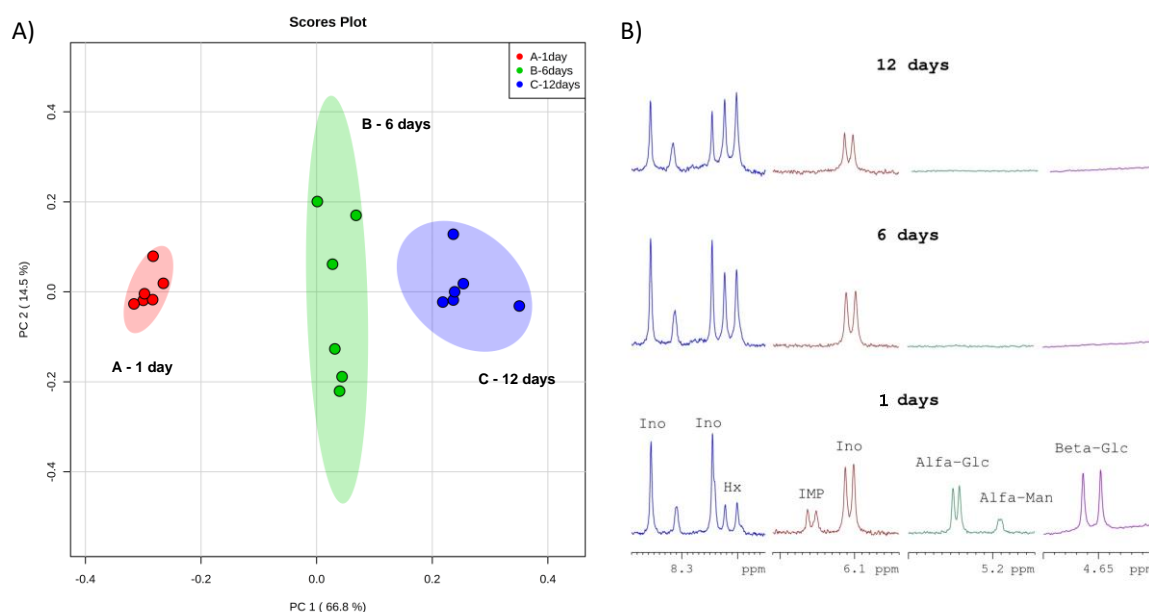


Figure 2. Left A) Scores plot between PC1 and PC2. Each data point corresponds to one pork exudate sample. The explained variances are shown in brackets. Right B) Expanded regions of ^1H spectra of pork exudates at 1, 6 and 12 days of storage. The graphic shows the evolution of nucleotides (IMP, Ino and Hx) and degradation of sugars (α , β -Glc and α -Man) involved in meat storage processes.

The PCA score plot for the first two PCs (Fig. 2A) shows a clear cluster of the exudate spectra according with their storage time explaining 81.3% of the total variance. The best direction that explains the variance in the data set (PC1) resulted closely related to sample storage.

The important features identified by one-way ANOVA and post-hoc analysis (Table S1 in supplementary data) correspond with buckets connected with the expected metabolic changes that take place during beef storage (Castejón et al., 2015). Fig. 2B illustrates, in terms of spectral peak variations, the main nucleosides (IMP, Ino and Hx) and sugar (α , β -Glc and α -Man) changes that can be detected in pork exudate spectra due to the meat evolution during the storage times considered. Regarding nucleotides, figure reflects the well-known storage degradation pathway (ATP/ADP>AMP>IMP>Ino>Hx>Xn). It is important to note that the nucleotide profile in pork exudate had the same behavior that previously was observed on samples of beef exudate. In fact, this profile after 12 days of storage was practically the same in both species. On the other hand, figure shows the signals from anomeric protons of carbohydrates. Signals from α , β -Glc and α -Man were observed at one postmortem day but after 6 days of storage they were not longer detected. This evolution, related to microbial degradation, is contrary to what was observed in beef exudates where after 12 days of storage the characteristic doublets of the carbohydrates could be observed. Therefore, the analysis of the evolution of sugars could serve as an indicator of the microbial load present and also, depending on the final fermentation products detected in the ^1H -NMR spectrum, could get information about the types of microorganisms present (Müller, 2008). There were also significantly buckets related with the increase levels of free amino acids, associated with the proteolysis process which starts after slaughtering, and the transformation of Gln to Glu that happen during storage.

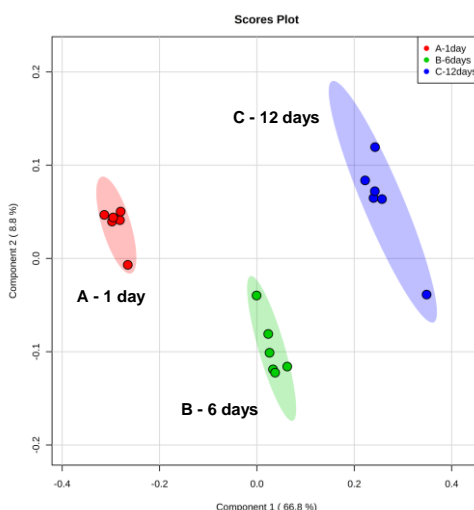


Figure 3. Multivariate analysis using PLS-DA. PLS-DA 2D score plot of component 1 versus component 2 (66.8% and 8.8% respectively) for comparison of the global metabolite profiles of pork exudates stored at 1, 6 and 12 days

To maximize the differences between groups and to determine the main variables that contribute to discrimination, a supervised pattern recognition method was further employed for spectral data. As shown in the PLS-DA score plots (Fig. 3), the exudate samples with different storage time were clearly separated into three groups according with the three storage times analyzed. Therefore, both the unsupervised (PCA) and the supervised (PLS-DA) analysis revealed a notable and consistent separation between the three groups according with their storage time.

3.1.3 NMR-based evaluation of irradiation treatment

In order to isolate the effect of irradiation treatment, we focused on exudate samples at one day of storage. Analysis of these exudate NMR spectra at 0, 1, 2 and 6 kGy did not show significant differences or characteristic signals that could be associated with preservative treatments that use beta radiation as previously was described in the literature (Castejón et al., 2015; Zanardi et al., 2015; Villa et al., 2013). The PLS-DA supervised analysis of the four groups did not show a classification according to the dose of irradiation applied although a trend was observed (see Figure S1 in supplementary information). This tendency has been associated with the conservative effect of irradiation. The non-irradiated samples already undergone an evolution during the first 24 hours of storage.

3.1.4 NMR-based evaluation of storage and irradiation treatment.

In order to evaluate jointly the effect of storage time and the dose of irradiation applied, an unsupervised multivariate analysis of the 72 samples (6 porks x 4 doses x 3 storage times) was performed, where a Pareto data scaling showed the best PCA classification (Figure 4).

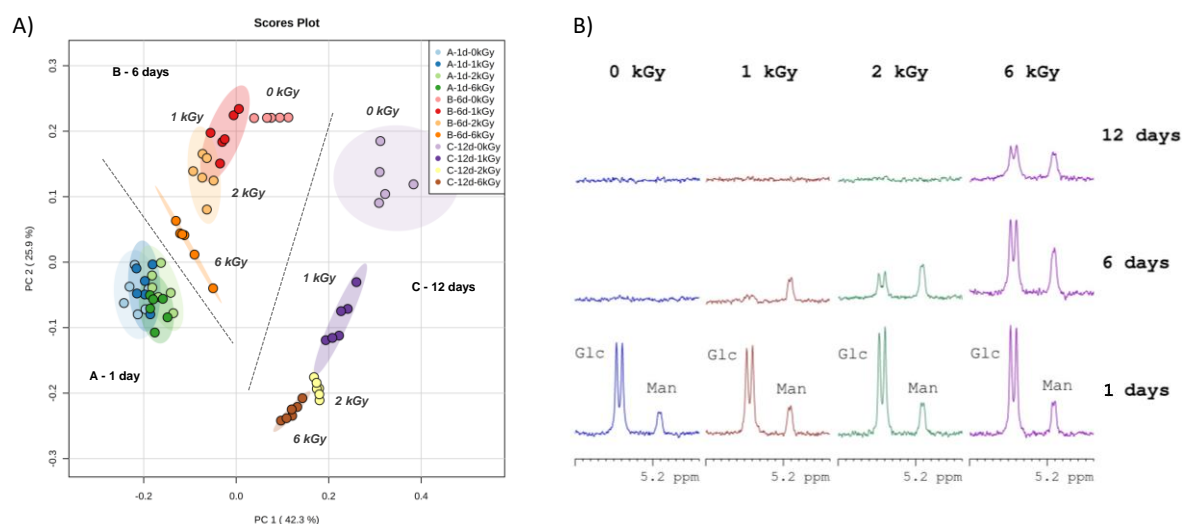


Figure 4. **A)** Scores plot between PC1 and PC2. Each data point corresponds to one pork exudate sample. The explained variances are shown in brackets. **B)** Expanded regions of ¹H spectra from non-irradiated (0 kGy) and irradiated (1, 2 and 6 kGy) samples of pork exudates stored during 1, 6 and 12 days. Abbreviations: Glc, Glucose; Man, Mannose.

As it is known, PCA is an unsupervised method aiming to find the directions that best explain the variance in a data set (X) without referring to class labels (Y). The explained variance of each PC is shown in the corresponding diagonal cell. In our analysis with only 5 PCs, 87.7% of the variance was explained. The first principal component (PC1) explained 42.3% of the variance in the initial data set, the second one (PC2) explained 25.9% and the third (PC3) 8.3%. Figure 4 shows the 2D PCA score plot where the classification of the groups according to their storage time is clearly observed. In addition, the longer the storage time the easier is the classification between groups of the same storage time as a function of the dose of irradiation applied. As reported by the chart, PC1 mostly accounted for exudate classification according to meat storage while PC2 seems to separate the samples in accordance with irradiation dose. In Fig. 4B, the ^1H -NMR expanded regions shows metabolite degradation during storage and how these changes could be slowed down by the effect of E-beam irradiation treatment. As shown in the figure, the intensity of Glc and Man signals and therefore, their concentration, seems to have a clear correlation with applied irradiation dose. After 1 kGy a preservative effect is shown and this effect increase with the applied dose. This behavior had a good correlation with previous works developed in our laboratory on samples of smoked and fresh salmon (Villa et al., 2013; Castejón et al., 2016). However, in this case, the conservative effect of the E-beam irradiation was noticeably lower. This fact is not conflicting, since, as it has been demonstrated, and it was expected, the irradiation dose needed to achieve the desired benefit in each product depends on its intrinsic characteristics.

3.2 Correlations among metabolite peak integrals, storage time and irradiation dose.

As we have previously observed, ^1H -NMR spectroscopy, as a non-specific detection method, allows monitoring the evolution of the main metabolites present and as a consequence, the different processes associated with storage. In the same way, it is possible to evaluate the effect of a conservation method applied through the integral of selected sentinel metabolites. Hence, a correlation between these variables could result in a predictive model. For a better understanding of these relations, the estimated response surface for the pork exudates metabolite integral (nucleotides and carbohydrates described above) using storage time (days) and irradiation dose (kGy) is shown in Fig. 5.

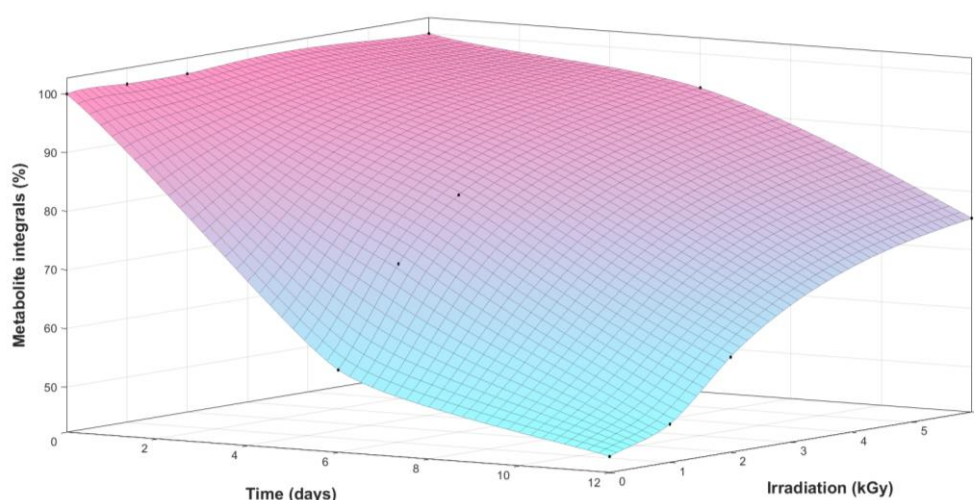


Figure 5. Response surface plot showing the relation of the percentage of metabolite integral versus storage time and irradiation dose.

The figure clearly shows how metabolite integral is affected by storage time and irradiation dose applied. The correlation study carried out between the values of the integrals of the selected metabolites, storage times and irradiation dose applied allowed to define a predictive model according to the regression equation ($R^2 = 0.96$), meaning, T= Time (days) and ID= Irradiation dose (kGy):

$$\text{Metabolite integral} = 94.87 - 5.19 * T + 5.47 * ID + 0.05 * T^2 + 0.42 * T * ID - 0.69 * ID^2$$

According to the results, the effect and the interaction of the irradiation dose and the storage time had a clear influence on the value of the integral of the selected metabolites from exudate of pork and this effect could be predicted with the proposed model. This study reaffirms the potential of the exudate as a new food matrix to monitor and to control meat systems and raises the possibility that the NMR-based metabolomic analysis of meat exudate could lead to be an official method to myosystems monitorization.

4. Conclusions

The analysis of the metabolic profile of pork exudate provides valuable information about the changes that the different compounds suffer during storage and how these changes have been affected by the conservative treatment with E-beam irradiation. The spectral information allowed to monitor the metabolic changes associated with the storage process and to evaluate as much the conservative as dose effects of the irradiation treatment. In addition, it was possible to establish relationships among the value of the metabolites integral with the absorbed radiation dose and the storage time, which permitted to obtain a predictive model. These findings could be the first step to develop a new method for non-destructive analysis and for the control of meat conservation as well as to evaluate irradiation treatment.

5. Supporting Information

Supplementary materials related to this article can be found online at <http://>

6. Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from MICINN (grants AGL2010-19158 and CTQ2010-14936) and the members of the CAI of NMR and RSE of the Complutense University for the cooperative collaboration, with special mention to Elena Sáez.

References

- Alonso-Salces, R. M., Moreno-Rojas, J. M., Holland, V. M., Reniero, F., Guillou, C., Serra, F., & Segebarth, N. (2007). NMR and Isotopic Fingerprinting for Food Characterization. European Commission.
- [ASTM] American Society for Testing and Materials. (2000). E1650-97e1 Standard Practice for Use of Cellulose Acetate Dosimetry Systems. Standards on Disc, 12.
- Benet, I., Ibañez, C., Guàrdia, M. D., Solà, J., Arnau, J., & Roura, E. (2015). Optimization of stir-bar sorptive extraction (SBSE), targeting medium and long-chain free fatty acids in cooked ham exudates. *Food Chemistry*, 185, 75-83.
- Bertram, H. C. (2017). NMR spectroscopy and NMR metabolomics in relation to meat quality. In Elsevier (1st Ed.) *New Aspects of Meat Quality: From Genes to Ethics*, (Chapter 13).
- Capitani, D., Sobolev, A. P., Tomassini, A., Sciubba, F., De Salvador, F. R., Mannina, L., & Delfini, M. (2012). Peach fruit: metabolic comparative analysis of two varieties with different resistances to insect attacks by NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1718-1726.
- Castejón, D., Villa, P., Calvo, M. M., Santa-María, G., Herraiz, M., & Herrera, A. (2010). ¹H-HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48(9), 693-703.
- Castejón, D., García-Segura, J. M., Escudero, R., Herrera, A., & Cambero, M. I. (2015). Metabolomics of meat exudate: Its potential to evaluate beef meat conservation and aging. *Analytica chimica acta*, 901, 1-11.
- Castejón, D., García-Segura, J. M., Herrera, A., & Cambero, M. I. (2016). NMR-detection of methylamine compounds in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subjected to E-beam irradiation. *Food Control*, 60, 455-460.
- Chauhan, S. K., Kumar, R., Nadanasabapathy, S., & Bawa, A. S. (2009). Detection methods for irradiated foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(1), 4-16.
- Cheng, J. H., Dai, Q., Sun, D. W., Zeng, X. A., Liu, D., & Pu, H. B. (2013). Applications of non-destructive spectroscopic techniques for fish quality and safety evaluation and inspection. *Trends in Food Science & Technology*, 34(1), 18-31.
- Farkas, J. (2006). Irradiation for better foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17(4), 148-152.
- FAO, W. F. P. IFAD (2012). The state of food insecurity in the world 2012. Economic Growth is necessary but not Sufficient to Accelerate Reduction of Hunger and Malnutrition. FAO, Rome, Italy, 1-61.
- García-García, A. B., Lamichhane, S., Castejón, D., Cambero, M. I., & Bertram, H. C. (2018). ¹H HR-MAS NMR-based metabolomics analysis for dry-fermented sausage characterization. *Food Chemistry*, 240, 514-523.
- García-Márquez, I., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., & Cabeza, M. C. (2012). Shelf-life extension and sanitation of fresh pork loin by E-beam treatment. *Journal of Food Protection*, 75(12), 2179-2189.
- Kim, G. D., Jung, E. Y., Lim, H. J., Yang, H. S., Joo, S. T., & Jeong, J. Y. (2013). Influence of meat exudates on the quality characteristics of fresh and freeze-thawed pork. *Meat Science*, 95(2), 323-329.
- Jung, Y., Lee, J., Kwon, J., Lee, K. S., Ryu, D. H., & Hwang, G. S. (2010). Discrimination of the geographical origin of beef by ¹H NMR-based metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), 10458-10466.
- Li, P., Wang, T., Mao, Y., Zhang, Y., Niu, L., Liang, R., & Luo, X. (2014). Effect of ultimate pH on postmortem myofibrillar protein degradation and meat quality characteristics of Chinese yellow crossbreed cattle. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Listrat, A., Lebret, B., Louveau, I., Astruc, T., Bonnet, M., Lefaucheur, L., & Bugeon, J. (2016). How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. *The Scientific World Journal*. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3182746>.
- Mannina, L., Sobolev, A. P., & Viel, S. (2012). Liquid state ¹H high field NMR in food analysis. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 66, 1-39.

- Martinez, I., Bathen, T., Standal, I. B., Halvorsen, J., Aursand, M., Gribbestad, I. S., & Axelson, D. E. (2005). Bioactive compounds in cod (*Gadus morhua*) products and suitability of ^1H NMR metabolite profiling for classification of the products using multivariate data analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(17), 6889-6895.
- Müller, V. (2008). Bacterial Fermentation. In Encyclopedia of Life Sciences (ELS), John Wiley & Sons, Chichester, 1-8.
- Pioselli, B., Paredi, G., & Mozzarelli, A. (2011). Proteomic analysis of pork meat in the production of cooked ham. *Molecular Biosystems*, 7(7), 2252-2260.
- Ritota, M., Casciani, L., Failla, S., & Valentini, M. (2012). HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis meat characterization. *Meat Science*, 92(4), 754-761.
- Rodrigues, J. E. A., Erny, G. L., Barros, A. S., Esteves, V. I., Brandão, T., Ferreira, A. A., & Gil, A. M. (2010). Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods. *Analytica Chimica Acta*, 674(2), 166-175.
- Siciliano, C., Belsito, E., De Marco, R., Di Gioia, M. L., Leggio, A., & Liguori, A. (2013). Quantitative determination of fatty acid chain composition in pork meat products by high resolution ^1H NMR spectroscopy. *Food chemistry*, 136(2), 546-554.
- Sofos, J. N. (2008). Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat science*, 78(1), 3-13.
- Straadt, I. K., Aaslyng, M. D., & Bertram, H. C. (2014). An NMR-based metabolomics study of pork from different crossbreeds and relation to sensory perception. *Meat Science*, 96(2), 719-728.
- Sundekilde, U. K., Rasmussen, M. K., Young, J. F., & Bertram, H. C. (2017). High resolution magic angle spinning NMR spectroscopy reveals that pectoralis muscle dystrophy in chicken is associated with reduced muscle content of anserine and carnosine. *Food Chemistry*, 217, 151-154.
- Villa, P., Castejón, D., Herraiz, M., & Herrera, A. (2013). ^1H -HRMAS NMR study of cold smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) treated with E-beam. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 51(6), 350-357.
- World Health Organization. (1999). High-Dose Irradiation: Wholesomeness of Food Irradiated with Doses above 10 kGy. World Health Organization, No. 890.
- Xia, J., Sinelnikov, I. V., Han, B., & Wishart, D. S. (2015). MetaboAnalyst 3.0—making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W251-W257.
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2016). Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, <http://dx.doi.org/10.1002/cpbi.11>.
- Zanardi, E., Caligiani, A., Palla, L., Mariani, M., Ghidini, S., Di Ciccio, P. A., & Ianieri, A. (2015). Metabolic profiling by ^1H NMR of ground beef irradiated at different irradiation doses. *Meat science*, 103, 83-89.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

(3 pages)

Manuscript entitled: Evaluation of E-beam Irradiation and Storage Time in Pork Exudates Using NMR Metabolomics

García-García, A.B.; Herrera, A.; Fernández-Valle, M. E.; Cambero, M.I.; Castejón, D.

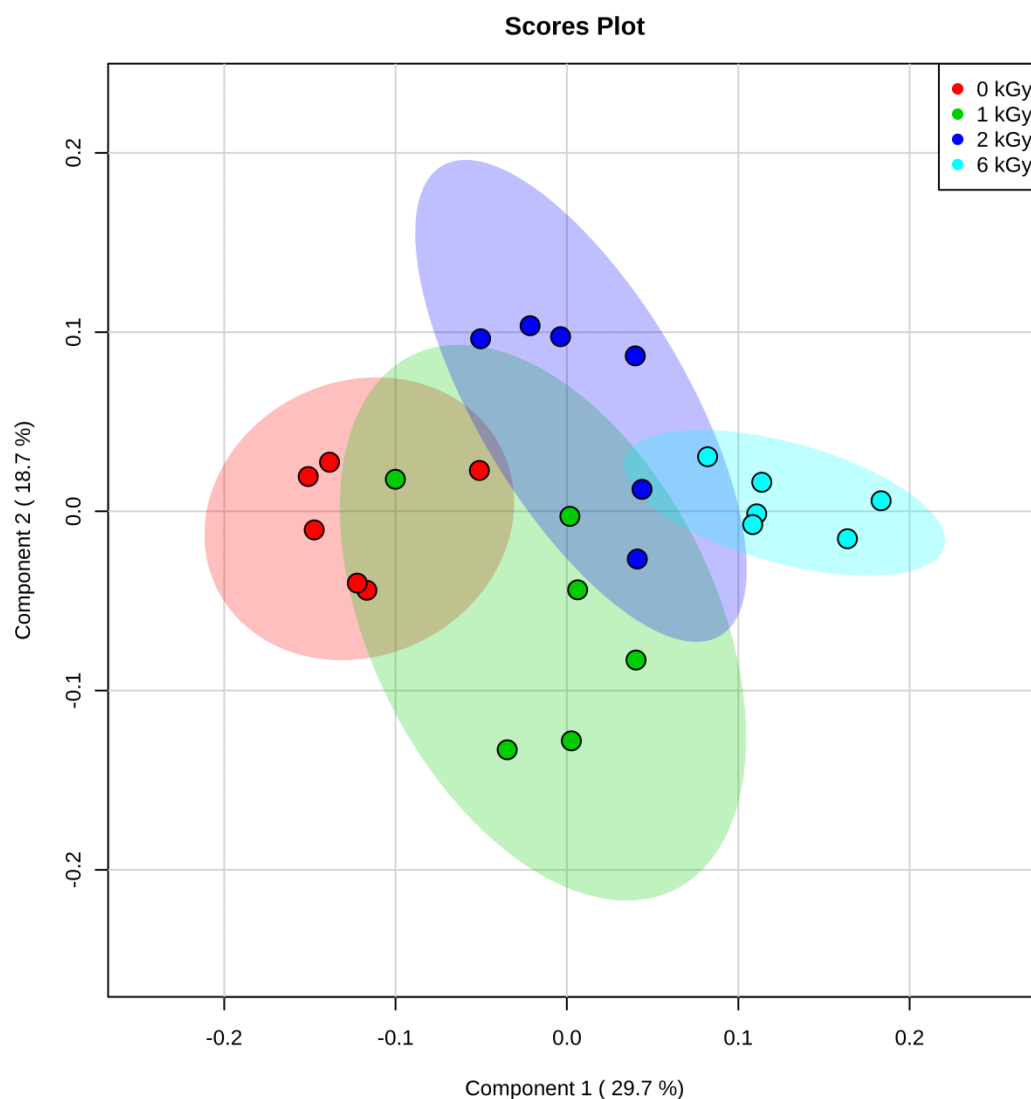
Table of contents

1). Table S1. Variable buckets used for the multivariate data analysis.....	p. 16
2). Figure S1. Scores plot between PC1 and PC2.....	p. 17
3). Figure S2. Exudates vs intact muscle samples spectra	p. 18

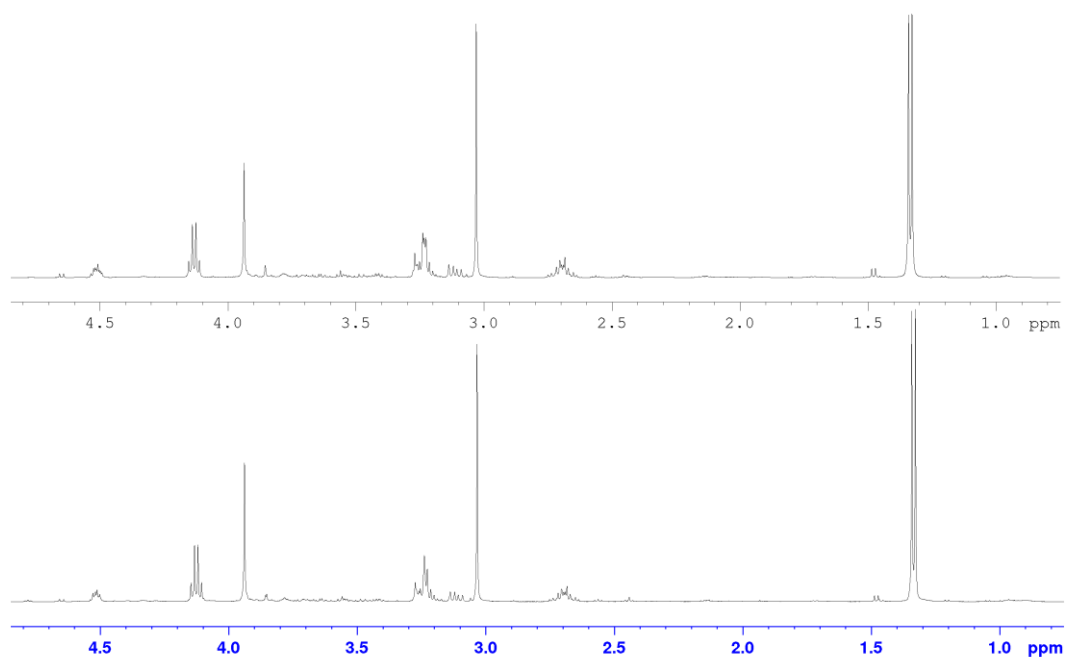
1). Table S1. Variable buckets used for the multivariate data analysis. The table includes the magnitude of their variation during storage and the assignment of the main metabolites present in each bucket.

Name	f.value	p.value	menosLOG10(p)	FDR	Post-hoc tests	0-6 days	6-12 days	Main Metabolite
2.54	438.11	4.96E-14	13.30	5.16E-12	1 - 12; 6 - 12	↓	↓	Gln
3.42	423.16	6.41E-14	13.19	5.16E-12	1 - 12; 1 - 6	↓	↓	α,β-Glc
8.22	412.49	7.74E-14	13.11	5.16E-12	12 - 1; 6 - 1	↑	↑	Hx
0.98	387.91	1.22E-13	12.92	5.16E-12	12 - 1; 6 - 1; 12 - 6	↑	↑	Ile, Val, Leu
3.62	387.87	1.22E-13	12.92	5.16E-12	12 - 1; 6 - 1	↑	↔	Thr, Val
3.26	376.94	1.50E-13	12.82	5.31E-12	12 - 1; 12 - 6	↔	↑	NI
4.66	329.28	4.05E-13	12.39	1.13E-11	1 - 12; 1 - 6	↓	↔	β-Glc
3.46	327.15	4.25E-13	12.37	1.13E-11	1 - 12; 1 - 6	↓	↓	β-Glc
5.26	237.17	4.45E-12	11.35	1.05E-10	1 - 12; 1 - 6	↓	↓	α-Glc
2.74	232.72	5.11E-12	11.29	1.08E-10	12 - 1; 12 - 6	↑	↑	NI
3.50	228.42	5.85E-12	11.23	1.13E-10	1 - 12; 1 - 6	↓	↓	α-Glc
2.50	206.83	1.20E-11	10.92	2.12E-10	1 - 12; 1 - 6; 6 - 12	↓	↓	Gln
3.74	182.64	2.95E-11	10.53	4.81E-10	1 - 12; 1 - 6	↓	↓	β-Glc
3.82	165.90	5.89E-11	10.23	8.92E-10	1 - 12; 1 - 6	↓	↓	α-Glc
7.14	153.96	1.01E-10	10.00	1.34E-09	1 - 12; 6 - 12	↓	↓	NI
8.26	153.57	1.02E-10	9.99	1.34E-09	1 - 12; 1 - 6	↓	↓	Ino, AMP
5.22	152.55	1.07E-10	9.97	1.34E-09	1 - 12; 1 - 6	↓	↓	α-Glc
6.10	140.83	1.90E-10	9.72	2.04E-09	1 - 12; 1 - 6	↓	↓	Ino
2.46	140.63	1.92E-10	9.72	2.04E-09	1 - 12; 1 - 6	↓	↓	Gln
3.86	139.75	2.01E-10	9.70	2.04E-09	1 - 12; 1 - 6	↓	↔	α-Glc, Ino
2.82	139.60	2.02E-10	9.69	2.04E-09	1 - 12; 6 - 12	↔	↓	NI
7.02	134.44	2.64E-10	9.58	2.55E-09	1 - 12; 6 - 12	↓	↓	NI
4.46	131.53	3.09E-10	9.51	2.85E-09	1 - 12; 1 - 6	↓	↓	Ino, IMP

Abbreviations: AMP, Adenosine 5'-phosphate; Glc, Glucose; Gln, Glutamine; Hx, Hypoxanthine; Ile, Isoleucine; IMP, Inosine 5'-phosphate; Ino, Inosine; Leu, Leucine; NI, Not Identified; Thr, Threonine; Val, Valine.



2). Figure S1. PLS-DA scores plot between Component-1 and Component-2. Each data point corresponds to one pork exudate spectrum at one day of store time at 0, 1, 2 and 6 kGy. The explained variances are shown in brackets.



3). Figure S2. Representative exudates vs intact muscle samples spectra. Region between 1.00 and 4.5 ppm is shown. The same metabolites are present in each sample type.

V. Discusión integradora

Con el desarrollo de esta Tesis Doctoral se ha pretendido avanzar en la aplicación de la RMN al análisis de alimentos, profundizando en el potencial de las distintas técnicas de RMN para el estudio de miosistemas de naturaleza cárnica. Así, se ha empleado la IRM para la monitorización del proceso de elaboración de jamón curado, se ha utilizado la relaxometría T_2 de RMN para el análisis de productos cárnicos elaborados a partir de piezas cárnicas enteras (jamón curado) y a partir de carne picada (embutidos crudos curados) con el fin de estudiar los cambios en la movilidad y distribución del agua y la grasa y su relación con la microestructura del producto y se ha recurrido a la espectroscopía de RMN para el análisis de distintas matrices cárnicas (jamón curado, embutidos crudos curados y exudados cárnicos) tratando de evaluar y monitorizar distintos procesos (curado, fermentación e irradiación). En definitiva, el objetivo global planteado fue dar un paso más en la aplicación de la RMN a la monitorización y control de procesos en la industria cárnica. Tras el análisis conjunto de los resultados obtenidos, consideramos que se han conseguido importantes aportaciones de interés científico y técnico.

En este apartado de la memoria se discuten en conjunto las distintas experiencias realizadas, la conexión existente entre ellas y la relación entre los resultados obtenidos. Por último, se analizan las posibles aplicaciones industriales de los resultados obtenidos y su posible proyección en futuras investigaciones.

V.1. ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE DERIVADOS CÁRNICOS

V.1.1. APLICACIÓN DE LA IRM AL ESTUDIO DE LA MACROESTRUCTURA DE JAMÓN CURADO

El jamón curado es un derivado cárnico muy apreciado por los consumidores por su gran calidad sensorial y nutritiva, condicionadas por las particularidades del animal del que procede, de su alimentación y del proceso de elaboración. Se trata de un producto de indiscutible valor añadido que requiere un control exhaustivo en todas las etapas de su procesado.

Las particularidades de este producto se deben a un proceso complejo, *el curado*, caracterizado fundamentalmente con la solubilización proteica. Por otra parte, el hecho de que este producto se elabore a partir de la extremidad posterior del cerdo, conservando toda su integridad anatómica, condiciona de forma substancial su evolución desde producto fresco a producto madurado. En definitiva, se trata de un miosistema complejo en el que el desarrollo de atributos sensoriales depende de múltiples factores difíciles de controlar y predecir.

Estudios previos han demostrado el potencial de la IRM como herramienta no destructiva para el análisis de jamón curado. Dichos estudios se han centrado, principalmente, en la estimación de la composición corporal del cerdo (Mitchell et al., 2001) y la distribución del contenido de agua y grasa en la matriz cárnica (Caro et al., Dolata et al., 2003). Más recientemente, la IRM en combinación con un método de análisis de imagen automatizado se ha utilizado para la caracterización y reconocimiento de los distintos músculos en jamón ibérico. Estos estudios han permitido establecer una descripción cuantitativa del volumen y la evolución de la relación humedad/peso durante el curado (Antequera et al., 2007). Pérez-Palacios et al., 2011 estudiaron, también en cerdo ibérico, el efecto de distintos tipos de dieta sobre las características del músculo porcino. Finalmente, la IRM junto con la relaxometría de bajo campo, se empleó para el estudio del curado de distintos músculos en jamón de Parma (Fantazzini et al., 2009).

En el **Trabajo 1** de la presente Tesis Doctoral se ha utilizado la IRM para explorar y monitorizar los cambios macroestructurales asociados al curado de jamón procedente de cerdo blanco. Los datos de IRM permitieron la obtención de los mapas de los tiempos de relajación transversal espín-espín (T_2), longitudinal espín-red (T_1) y del coeficiente de difusión aparente (CDA). Este trabajo ahonda en el estudio de la macroestructura de jamón curado, complementando la información bibliográfica previamente obtenida sobre T_2 y T_1 y, de forma novedosa, incluye el cálculo de CDA, parámetro que no había sido analizado en estudios previos.

Los mapas T_2 aportan mucha información estructural. En ellos, las tonalidades oscuras (hipointensidades) corresponden a bajos valores de T_2 . Las demás tonalidades (desde grises oscuros hasta blanco brillante) indican un incremento de este parámetro, tanto más elevado cuanto más clara (hiperintensa) se presenta la zona de estudio, indicando diferentes grados de interacción de los ^1H de agua y de la grasa con la matriz proteica. Según avanza la maduración, la estructura cárnica se oscurece debido a la bajada de T_2 que se produce por la pérdida de agua libre y a la presencia de agua poco ligada, sin embargo, la grasa permanece hiperintensa durante todo el proceso.

En los mapas T_1 , las intensidades más claras y brillantes indican valores de T_1 más altos asociados a un mayor contenido de agua libre, con elevada movilidad y dificultad para ceder su energía al medio. La asociación del agua a macromoléculas produce una reducción del T_1 , lo que se manifiesta en tonalidades grisáceas, más oscuras cuanto menor es el valor de T_1 . De forma similar, la pérdida de agua dará lugar a un oscurecimiento de las zonas en proporción al descenso del valor de T_1 . Además, las zonas de tejido adiposo en estos mapas aparecen oscuras, debido a que la grasa posee un valor de T_1 bajo.

En los mapas CDA las zonas donde hay mayor difusión de agua se muestran con tonalidades claras y brillantes, mientras que las estructuras densas y organizadas, con bajo CDA, aparecen oscuras.

En conjunto, en este trabajo se ha observado que los mapas T_2 permiten el análisis de la macroestructura del jamón, los mapas T_1 y de T_2 facilitan el seguimiento de la pérdida de agua y del proceso de maduración del producto y los mapas CDA informan

acerca de la movilidad molecular en el sistema, favorecida por las dinámicas de salado y deshidratación. Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos realizados en jamón de Parma (Fantazzini et al., 2009). En ambos casos se observa claramente que los cambios estructurales (seguidos mediante las variaciones de T_1 y T_2) a través del tiempo de maduración dependen del tipo de músculo analizado, cuya localización anatómica y su grado de exposición al aire condicionan la velocidad de los procesos de deshidratación y absorción de sal.

En la presente Tesis Doctoral el empleo de la IRM resultó muy útil para la obtención de imágenes de la sección interna de distintos músculos de jamón. Frente a otras técnicas de imagen, la IRM ofrece la posibilidad de obtener parámetros cuantitativos, como son los valores medios de T_1 , T_2 y CDA, que permiten el procesamiento estadístico y el establecimiento de relaciones entre atributos estructurales, características fisicoquímicas y propiedades reológicas. El análisis de las imágenes, a través del cálculo de los tiempos de relajación anteriormente mencionados y el CDA, permitió la discriminación entre el tejido muscular y los depósitos de grasa. Esta técnica ha permitido el seguimiento de los cambios estructurales de los componentes de la pieza cárnica a lo largo de las distintas etapas de elaboración (véase apartado 1.4.3.3.). En estudios previos, se ha demostrado que las medidas volumétricas de grasa y músculo de regiones bien definidas de la espalda y pata del cerdo proveen información precisa de la composición corporal total del cerdo (Mitchell et al., 2001) pudiendo incluso utilizarse esta técnica como método de clasificación de canales. En este trabajo se refuerza la idea de emplear la IRM para monitorizar, de forma no destructiva, el proceso de producción de jamón curado, principalmente, a través del seguimiento del curso de la transferencia de agua y sal. Este procedimiento facilitaría en gran medida el control en las líneas de producción. Adicionalmente, en esta Tesis Doctoral se ha propuesto establecer relaciones matemáticas entre los parámetros de relajación de IRM (T_2 , T_1 y CDA) y el comportamiento reológico del derivado cárnico lo que permitiría la predicción de parámetros de textura, como la dureza. Con esta nueva proyección de aplicación de los parámetros de IRM, se abre la posibilidad de incorporar las técnicas no destructivas de resonancia a la estimación de la calidad de las piezas de jamón y a la determinación de los tiempos más adecuados de consumo. Este aspecto requiere mayores investigaciones

para relacionar los parámetros de IRM con la percepción sensorial del comportamiento reológico y constituyen una de las líneas de trabajo futuro abiertas para proseguir a partir de los resultados expuestos en la presente Tesis Doctoral.

V.1.2. APLICACIÓN DE LA RELAXOMETRÍA T_2 DE RMN AL ESTUDIO MICROESTRUCTURAL DE DISTINTAS MATRICES CÁRNICAS

En el afán de profundizar en el estudio de los cambios estructurales que acontecen durante el proceso de maduración de los derivados cárnicos, se recurrió al análisis de relaxometría T_2 de RMN para estudiar la microestructura de distintas matrices cárnicas (**Trabajos 2, 3 y 4**). Como se ha mencionado, el tiempo de relajación transversal (T_2) es una medida de las interacciones espín-espín, que aporta información estructural, en términos de movilidad nuclear y compartimentación, debido a que cada protón está influenciado por los núcleos de los diferentes componentes (agua, grasa, proteínas) de su entorno (Bertram y Andersen, 2004; Charlton, 2009). Este hecho conduce a que los sistemas complejos presentes diversos tiempos de relajación T_2 dependiendo del estado de los protones, siendo posible diferenciar distintas poblaciones con tiempos de relajación próximos y, por tanto, evaluar diferencias sutiles, aunque importantes, de la estructura de determinados tejidos.

Recientemente, la relaxometría T_2 de RMN se ha empleado, mayoritariamente, para estudiar la distribución y movilidad del agua dentro de la matriz cárnica (Bertram & Andersen, 2004). Los datos de relajación T_2 han sido ampliamente relacionados con la estructura miofibrilar de la carne y, por tanto, con su capacidad de retención de agua (Bertram & Andersen, 2004, McDonnell et al., 2013; Pearce et al., 2011), propiedad determinante de la calidad final del producto.

En el músculo cárnico, como sistema heterogéneo que es, la relajación es multiexponencial (Bertram & Andersen, 2007) y se han descrito diferentes poblaciones de agua definidas por constantes T_2 características:

- agua fuertemente asociada a macromoléculas, caracterizada por el tiempo de relajación T_{2b} . Es el componente minoritario de relajación más rápida (1-5 ms). Se podría considerar el agua de hidratación.

- agua incluida en el entramado de miofibrillas, atrapada en el interior de la red tridimensional proteica, determinada por el tiempo de relajación T_{21} . Con valores intermedios (40-80 ms) es el componente mayoritario en las muestras cárnicas y suele referenciarse como agua miofibrilar.
- agua localizada en los espacios extra-miofibrilares, caracterizada por T_{22} . Es la población de protones más móviles, de relajación más lenta (200-400 ms). Es el agua extramiofibrilar.

En la Figura V.I se representa la distribución de los distintos tipos de agua que han sido descritos en carne fresca mediante el uso de la relaxometría. En ella se pone de manifiesto el comportamiento multicomponente de la relajación T_2 , puesto que cada señal se corresponde con una población o grupo de protones con un grado de asociación determinado a la matriz proteica. En general, cuanto menor es T_2 , mayor será el grado de asociación o ligazón de los protones a las estructuras de la muestra.

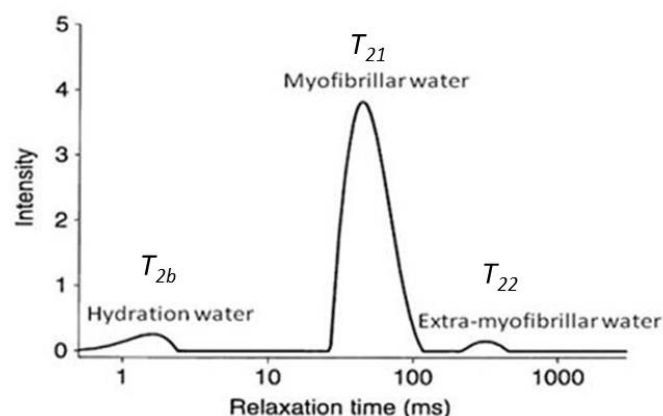


Figura V.I. Distribución de los tiempos de relajación T_{2b} , T_{21} y T_{22} en músculo de cerdo. Cuanto más fuertemente ligadas se encuentran las moléculas de agua, más corto es el tiempo de relajación T_2 . (Bertram y Andersen, 2008).

En la Figura V.2 se representa la estructura muscular y las localizaciones de los principales compartimentos del agua presente en la matriz miofibrilar y su relación con los mencionados tiempos de relajación. El agua intra-miofibrilar es retenida por las miofibrillas en el espacio entre filamentos. El agua extra-miofibrilar se encuentra en el sarcoplasma, en el espacio entre miofibrillas (agua inter-miofibrilar), entre las fibras musculares y en los espacios inter-fasciculares (agua inter-fascicular) y en el espacio extra-fascicular entre los fascículos musculares (agua extra-fascicular) (Pearce et al., 2011).

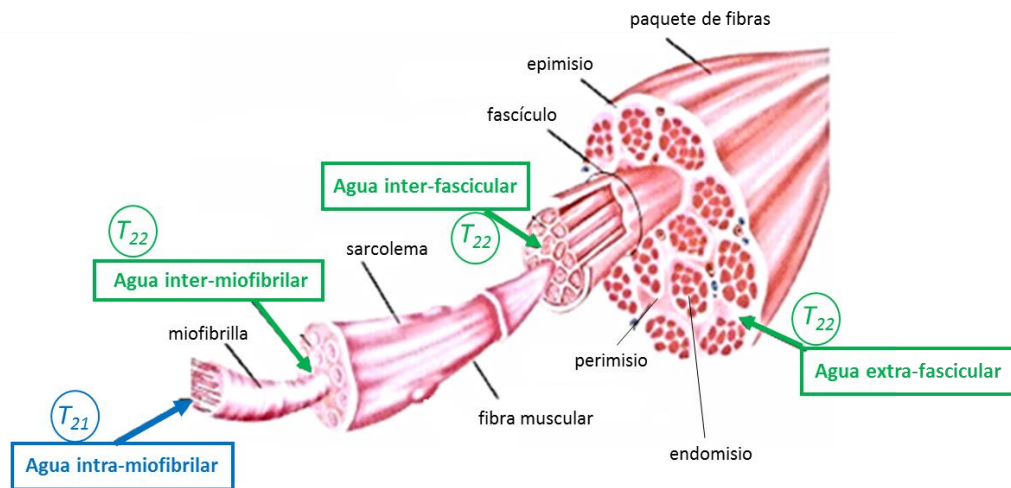


Figura V.2. Principales componentes musculares y localizaciones de los compartimentos del agua muscular (Adaptado de Pearce et al., 2011).

Para el desarrollo de esta Tesis, en primer lugar, nos centramos en la aplicación de la relaxometría de RMN sobre muestras de jamón curado y así complementar la información macroestructural obtenida mediante IRM durante el curado (**Trabajo 2**). Esta metodología permitió desgranar los valores medios de los tiempos de relajación T_2 mediante la obtención de las distribuciones continuas de los diferentes tiempos de relajación T_2 . De esta forma, fue posible obtener información relevante a nivel microestructural. Las modificaciones de las variables del proceso, aun siendo pequeñas, afectan a la microestructura, con la consiguiente repercusión en la macroestructura y en la percepción sensorial del producto. El análisis causa-efecto es de gran interés para la elaboración de alimentos y la industria alimentaria actual donde se busca la estandarización y unificación del producto final.

En segundo lugar, nos planteamos el estudio de la maduración en sistemas cárnicos modelo (**Trabajo 3**), y cómo este proceso se ve afectado por el empleo de proteasas exógenas (Pronasa E de *Streptomyces griseus* y aspartyl proteinase de *Aspergillus oryzae*), puesto que la adición de estas enzimas suele emplearse para acelerar las reacciones que modifican la textura y generan el flavor contribuir a la generación del flavor característico de los productos cárnicos curados (Díaz et al., 1993; Díaz et al., 1997). Por ello, es importante saber cómo estas enzimas afectan a la microestructura del producto y, por tanto, a la distribución y movilidad del agua, para entender cómo se

puede optimizar el proceso madurativo del sistema cárnico de elaboración de derivados cárnicos.

En tercer lugar, planteamos un estudio sobre la microestructura de productos comerciales, tipo chorizo y tipo salchichón, de maduración corta, con el fin de caracterizar su maduración y establecer modelos predictivos de las características fisicoquímicas y reológicas a partir de los distintos tiempos de relajación T_2 (**Trabajo 4**).

V.1.2.1. Modificaciones derivadas del curado de piezas cárnicas enteras *versus* matrices cárnicas picadas

El análisis de las distribuciones T_2 obtenidas para jamón curado (**Trabajo 2**), revela la existencia de distintos componentes T_2 distintos en las muestras cárnicas, en función del grado de asociación de los protones de la muestra con la matriz proteica: T_{2b} , T_{21} , T_{22} . Como se mencionó anteriormente en esta memoria, estos tres componentes han sido descritos previamente en la carne fresca (Bertram et al., 2001; Bertram et al., 2002; Bertram et al., 2004) y son comunes a los distintos derivados cárnicos [modelos cárnicos (**Trabajo 3**) y embutidos crudos curados (**Trabajo 4**)] examinados, si bien su presencia/ausencia se ve alterada dependiendo del producto y/o etapa de maduración. En este sentido, el componente mayoritario, T_{21} está presente siempre, sin excepción, y las diferencias entre productos y tiempos se hacen visibles a través de los componentes T_{2b} y T_{22} .

Cabe destacar una peculiaridad en las distribuciones T_2 obtenidas en productos elaborados a base de carne picada (**Trabajos 3 y 4**) y es que el componente T_{22} no está presente en todos los puntos del proceso de maduración, sino que se hace visible a partir del día 2 de producción, tanto en los sistemas modelo como en los embutidos crudos curados. De acuerdo con estudios previos (Ordóñez et al., 1999; Tornberg, 2005), puede decirse que en este punto del proceso comienza a producirse la verdadera modificación estructural del producto, puesto que hasta ese momento era solo una masa de carne picada. Su introducción en las cámaras de maduración, en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa, así como el desarrollo de la actividad microbiana anaerobia fermentativa durante las primeras horas del proceso condicionan que el fluido sistema proteico original inicie su transformación desde el estado “sol” hacia el

sistema coloidal “gel”. Esta transformación conduce al establecimiento de una red tridimensional proteica irreversible (Figura V.3) donde el agua se encuentra en un estado de menor movilidad correspondiente a valores más cortos de T_{21} (Gordon y Barbut, 1992; Li et al., 2014). En el interior de la cámara de maduración, el agua comienza a desplazarse por difusión, debido a la diferencia de humedad entre las piezas cárnicas y el ambiente, lo que conduce a la aparición de la población T_{22} , relacionada con esta fracción de agua extramiofibrilar más móvil. Este hallazgo constituye un hecho relevante puesto que los resultados sugieren que es necesario cierto grado de asociación o agregación proteica para la presencia del componente T_{22} en los derivados cárnicos elaborados a partir de carne de cerdo.

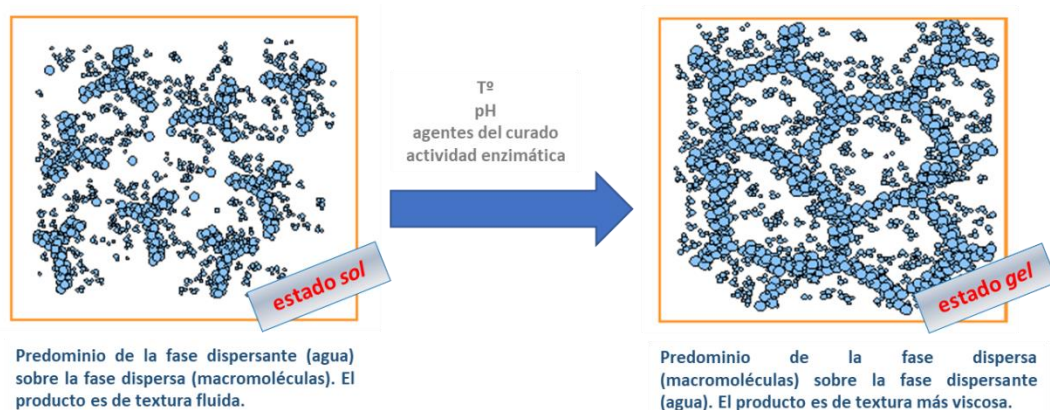


Figura V.3. Transformación desde estado sol hasta estado coloidal gel y constitución de la red tridimensional proteica.

Además de las tres poblaciones comunes con diferente T_2 mencionadas anteriormente (T_{2b} , T_{21} y T_{22}), en los modelos cárnicos y en los embutidos curados, fue posible identificar una cuarta población, T_{2b2} , que se atribuye a la característica adición de sal en este tipo de productos (Andersen et al., 2007; Møller et al., 2010; García-García et al., 2015).

En todos los productos estudiados, el avance del curado se hizo patente en las distribuciones obtenidas. Por un lado, la deshidratación de la matriz proteica, propia del curado/maduración, se manifestó a través de cambios en la distribución y movilidad de los protones, de manera que en las distribuciones T_2 se produjo un desplazamiento de las señales hacia tiempos de relajación más cortos, especialmente visible a través del componente mayoritario T_{21} . Este comportamiento fue descrito previamente por Møller

et al., 2010 durante el proceso de elaboración de embutidos fermentados. Dicho desplazamiento se relaciona con un mayor grado de ligazón de los protones con la matriz, lo que sugiere un mayor grado de compactación de la misma a medida que avanza el proceso de maduración.

En el caso concreto del jamón curado (**Trabajo 2**), cabe destacar la presencia de una nueva población, T_2' , con un tiempo de relajación entorno a los 80 ms, no contemplado hasta el momento en la bibliografía. Este componente no está presente en todas las distribuciones de jamón, sino que se hace visible a partir de un cierto grado de curado, concretamente, durante la etapa de secado. El valor del tiempo de relajación de dicha señal (más largo que el agua intramiofibrilar y más corto que el agua extramiofibrilar), junto con el alto grado de infiltración de la grasa en la matriz muscular en este punto del proceso (Fernández et al., 2007), han llevado a asociar el componente T_2' con los protones de la fase grasa. Además, la obtención de imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) resultó de gran ayuda para interpretar las modificaciones estructurales. Su análisis permitió observar la reducción del tamaño intrínseco de poro de la matriz proteica, debido a los fenómenos de solubilización proteica, absorción de sal y deshidratación, típicos del curado, así como la visualización de la evolución de la infiltración grasa en el músculo.

Por tanto, en el caso del jamón curado (**Trabajo 2**), fue posible tanto monitorizar la maduración como observar cambios en la distribución de la grasa, gracias a la aparición de la señal T_2' , cuya presencia puede utilizarse como marcador de etapas avanzadas del curado. Además, se detectaron diferencias de comportamiento entre músculos, puesto que el efecto de la maduración se hizo más notorio en el músculo semimembranoso. El componente T_{21} en las distribuciones obtenidas para este músculo a partir de la etapa de post-salado presentó tiempos de relajación más bajos en comparación con el músculo bíceps femoral, sugiriendo que los fenómenos madurativos afectan más rápidamente al músculo semimembranoso que, por tratarse de un músculo externo, de contacto directo con el aire, experimenta antes los efectos de las dinámicas de difusión de agua y sal (Arnau et al., 1995) y eso se refleja en los tiempos de relajación.

Cabe destacar que el componente T_2' presente en jamón curado, no se hizo visible ni en las distribuciones T_2 obtenidas en los modelos cárnicos ni en los embutidos curados

(Trabajos 3 y 4). Sin embargo, sí aparece una señal similar en otros productos madurados, como el queso curado de oveja (Cruz-Díaz, 2016) en el que se describió un comportamiento bimodal de la relajación transversal T_2 , de forma que el componente que presentaba un tiempo de relajación más bajo ($T_2 < 20$ ms) se relacionó con una fracción de agua menos móvil asociada a la fracción proteica y el componente con un tiempo de relajación más largo ($T_2 = 20-80$ ms), se relacionó con la fracción de agua más móvil, asociada a la fase grasa. En relación con los quesos, otros autores coinciden en dicho comportamiento bimodal. Así, Kuo et al. (2001) y Luo et al. (2013) lo describieron en queso Mozzarella y Mulas et al. (2013) en queso Pecorino y queso Fiore Sardo.

Las diferencias en T_2 observadas entre productos se deben, en gran medida, a las diferencias estructurales de las materias primas de partida que condicionarán, posteriormente, todo el proceso de transformación. En todos los casos, durante el procesado, se buscó la consecución del gel cárnico que está íntimamente asociado al desarrollo de una textura adecuada del producto final. Como se ha comentado previamente, la gelificación de las proteínas miofibrilares requiere la desnaturalización parcial seguida de la agregación irreversible de las cadenas de miosina. Este proceso conduce al establecimiento de una red tridimensional proteica que retiene agua en su interior (Toldará y Flores, 1998).

Como se pone de manifiesto en esta Tesis, cuando el agua se elimina de un miosistema por un proceso de deshidratación, fenómenos como el incremento de la concentración local de sal, la solubilización de la miosina y los cambios en la interacción agua-macromoléculas debidos a la desnaturalización proteica, inducen una reducción en el espacio entre miofilamentos. Este hecho da lugar al descenso de la movilidad molecular, con la consiguiente aceleración de la relajación nuclear y la reducción de los tiempos de relajación (Ruiz cabrera et al. 2004, Vestegaard et al. 2005).

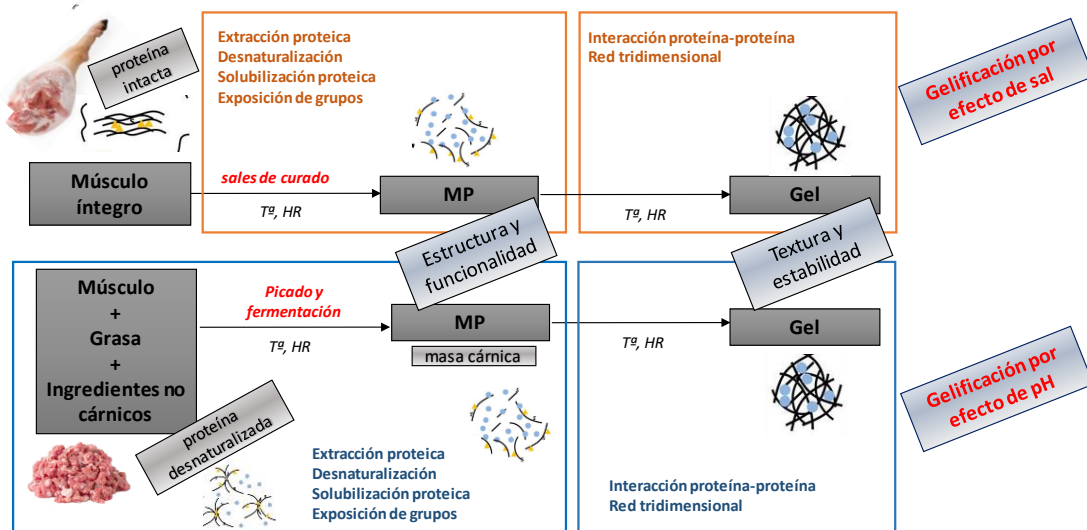


Figura V.4. Proceso de gelificación proteica en músculo íntegro y masa cárnica. MP: proteínas miofibrilares. HR: humedad relativa.

Existen numerosos factores que condicionan la gelificación proteica: pH, fuerza iónica, variables del proceso, concentración proteica, temperatura o la presencia de aditivos, entre otros (Sun y Holley, 2011). El jamón curado es un producto elaborado a partir del músculo íntegro que conserva su estructura miofibrilar intacta sometido al efecto directo de la sal, principal responsable de la solubilización proteica. Por otra parte, los modelos cárnicos y los embutidos crudos curados poseen una estructura tridimensional gelificada a partir de una masa dispersa que gelifica, principalmente, por pH (Figura V.4).

V.1.2.2. Efecto de la adición de proteasas

Respecto a los sistemas modelo con y sin adición de proteasa (**Trabajo 3**), cabe destacar que las distribuciones T_2 mostraron notables diferencias al comparar ambos lotes de productos (Díaz et al., 1997; Fernández et al., 2000). Estas diferencias se hacen visibles, sobre todo, en los componentes minoritarios, T_{2b} y T_{2b2} , y en el componente de relajación más lenta, T_{22} . Además, para ayudar a interpretar las distribuciones T_2 , se realizaron pruebas clásicas, como electroforesis SDS-PAGE y ensayo de fluorescamina. Con estas técnicas se pretendía observar desde distintos ámbitos qué ocurre con las proteínas miofibrilares durante un proceso de maduración con y sin adición de enzima. En este sentido, el patrón electroforético obtenido para las proteínas miofibrilares de ambos lotes fue significativamente diferente. En los modelos sin adición de proteasas se

produjo una degradación proteica progresiva que se corresponde con una situación normal de maduración. Sin embargo, en los modelos con proteasas, la degradación fue patente desde el principio, donde ya no fue posible distinguir compuestos de alto peso molecular debido a la proteólisis experimentada desde las etapas iniciales del proceso.

En los modelos sin proteasa, las poblaciones T_{2b} y T_{2b2} constituyen dos señales distintas hasta el día 3 de producción, aproximadamente. A partir de entonces, en la región entre 1-10 ms solo se distingue una única señal. Este hallazgo, también visible en los embutidos curados, se ha atribuido a la absorción de sal por parte de la matriz cárnica que tiene lugar durante el proceso de maduración. Sin embargo, en los modelos cárnicos a los que se les ha añadido proteasas exógenas, ambas poblaciones, T_{2b} y T_{2b2} , permanecen separadas casi durante todo el proceso y no es hasta el día 7, aproximadamente, cuando comienza a observarse un solo componente en la región comprendida entre 1-10 ms. Lo que ocurre en este lote de producto es que el efecto de la proteólisis impide que se produzca una adecuada absorción de la sal por la matriz proteica, de hecho, la aparición de una sola señal de T_2 bajo coincide con la aparición del componente T_{22} en este tipo de productos, lo cual sugiere la necesidad de cierto grado de agregación proteica para la aparición de estos fenómenos. La electroforesis apoya la teoría de que a partir del día 7 comienza a producirse un acercamiento entre las cadenas peptídicas previamente degradadas, probablemente favorecido por la deshidratación en este punto del proceso, cuya reorganización favorece la compactación de la matriz y los cambios mencionados previamente (García de Fernando et al., 1991, Ordóñez et al., 1999).

Los estudios de relaxometría T_2 sobre sistemas modelo y embutidos curados permiten monitorizar los cambios en la microestructura de los productos durante un proceso de curado, donde el avance de la maduración se traduce en un desplazamiento de las distribuciones hacia tiempos de relajación más bajos. Además, la distribución y movilidad de agua se vieron afectadas notablemente por la adición de proteasas a la masa cárnica, sugiriendo que esta metodología es adecuada para el estudio de cómo distintas condiciones de procesado pueden afectar a las características del producto final.

V.1.3. RMN Y CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE DERIVADOS CÁRNICOS

Las características fisicoquímicas más relevantes de los alimentos a analizar (pH, actividad de agua, capacidad de retención de agua, contenido en humedad, contenido en sal, contenido en grasa, entre otros) suelen obtenerse mediante análisis convencionales destructivos. Con el fin de explotar al máximo el potencial de las técnicas de RMN, en la presente Tesis se ha evaluado la aptitud de la IRM, en jamón curado (**Trabajo 1**), y de la relaxometría T_2 , en jamón curado (**Trabajo 2**) y embutidos crudos curados (**Trabajo 4**), como herramientas predictivas de atributos fisicoquímicos. Con este objetivo se han utilizado los parámetros de RMN T_1 , T_2 y CDA.

La posibilidad de utilizar la IRM para monitorizar los cambios del contenido en agua y la concentración en sal en jamón curado ha sido previamente documentada por otros autores. Guiheneuf et al., 1996 obtuvo mapas paramétricos de IRM (T_1 , T_2 y densidad protónica) de muestras de carne de cerdo curado que mostraron una disminución de estos parámetros en función del aumento de la concentración de NaCl. Además, se han establecido relaciones lineales ($p < 0,0001$) entre los contenidos de agua y de sal y los parámetros de IRM (T_1 y T_2) en el músculo *Longissimus dorsi* salado con distintos porcentajes de NaCl (Fantazzini, 2005). También se emplearon modelos de regresión múltiple para construir un modelo que permita determinar el contenido en sal en los músculos semitendinoso y bíceps femoral en jamón de Parma. T_1 , T_2 , su proporción (T_1/T_2) y la densidad protónica fueron los parámetros empleados para establecer este modelo, existiendo una alta correlación entre el contenido en sal ($R^2=0,90$, $p < 0,001$) y los parámetros de IRM (Fantazzini, 2009).

En el **Trabajo 1** de la presente Tesis, se establecieron modelos matemáticos para cada tipo de músculo estudiado (bíceps femoral, semimembranoso y semitendinoso) empleando el contenido en agua y el contenido en sal como variables dependientes y los parámetros de IRM (valores medios de T_1 , T_2 y CDA) como parámetros independientes. El cálculo de regresión lineal múltiple permitió observar una relación muy estrecha entre el contenido en agua y los parámetros de IRM ($R^2=0,97$ para BF; $R^2=0,98$ para SM y $R^2=0,97$ para ST; $p < 0,05$). El contenido en sal también resultó altamente correlacionado con dichos parámetros ($R^2=0,99$ para BF; $R^2=0,95$ para SM y $R^2=0,99$ para ST; $p < 0,05$).

En el **Trabajo 2**, se emplearon los valores de T_{21} obtenidos a partir de las distribuciones adquiridas mediante el estudio por relaxometría en muestras de jamón curado para establecer posibles correlaciones con el contenido en agua en los músculos bíceps femoral y semimembranoso. En este caso, se estableció una fuerte dependencia lineal positiva entre ambas variables, sugiriendo que la población T_{21} es un valioso parámetro “centinela” para monitorizar el curso del curado, puesto que su evolución en el tiempo es paralela a la deshidratación que marca el proceso.

En el **Trabajo 4**, la relación entre parámetros fisicoquímicos y relajación T_2 en embutidos crudos curados, tipo chorizo y salchichón, se estableció mediante el análisis bivalente de correlación de Pearson. En este caso, se observó un alto grado de correlación entre el componente T_{21} y la actividad de agua ($r = 0,88$, $p < 0,0005$), así como entre T_{21} y el contenido en agua ($r = 0,94$, $p < 0,0005$). Este mismo hecho también fue descrito en jamón curado (**Trabajo 2**). Este resultado confirma que la población T_{21} representa un porcentaje elevado del agua total contenida en la muestra, al contrario que T_{22} y, especialmente, T_{2b} , que mostraron un grado de correlación moderado y bajo, respectivamente, con dichos parámetros. Además, se estableció una asociación notable entre la población T_{21} y el pH ($r = 0,68$, $p < 0,0005$), dada la influencia que el pH tiene sobre la capacidad de retención de agua de las proteínas miofibrilares (Huff-Lonergan y Lonergan, 2005). Por otro lado, las poblaciones T_{2b} y T_{22} presentaron una relación más débil con el pH y es interesante destacar la relación negativa observada entre el pH y el T_{22} . De acuerdo con las distribuciones T_2 adquiridas a partir de estos derivados cárnicos, el descenso de pH es necesario para la presencia del componente T_{22} , de forma que, cuando el pH alcanza su mínimo, el T_{22} alcanza su máximo.

Estos trabajos han profundizado en el gran potencial de la RMN como herramienta predictiva de parámetros fisicoquímicos, extendiendo al máximo el concepto de técnicas de análisis no invasivas y no destructivas, puesto que a partir de un solo análisis de RMN sería posible determinar parámetros que, tradicionalmente, requerirían la invasión y/o la destrucción de la muestra.

V.1.4. RMN Y COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE DERIVADOS CÁRNICOS

Dada la importancia de la textura en la calidad final de los derivados cárnicos y, considerando su indiscutible relación con la estructura del producto, siendo una de las propiedades que más cambia durante un proceso de curado/maduración, se planteó su estudio a través de la determinación del comportamiento reológico de los productos estudiados. Para ello, se utilizó el análisis del perfil de textura (TPA) para el jamón curado (**Trabajo 1**) y los embutidos crudos curados (**Trabajo 4**). Por otra parte, se ha recurrido al ensayo de tracción uniaxial destructivo para determinar la fuerza necesaria para la rotura del tejido muscular en distintos puntos del proceso de elaboración de jamón curado (**Trabajo 2**).

El TPA es el ensayo de compresión más utilizado en el estudio de productos cárnicos dada sus posibilidades para emular el proceso de masticación. Existen múltiples referencias de aplicación de este análisis de derivados cárnicos (Muguerza et al., 2003; Herranz et al., 2005, Herrero et al., 2007; Herrero et al., 2008). Los ensayos de tracción se emplean habitualmente en Ciencia de los Materiales para estudiar la tenacidad (resistencia a la rotura y capacidad de absorber energía antes de la rotura) y la elasticidad. Sin embargo, estos ensayos han sido muy poco empleados en el análisis alimentos y, más concretamente, en el estudio de las propiedades reológicas de los productos cárnicos. No obstante, se han utilizado, por ejemplo, para determinar los cambios de las propiedades mecánicas de las fibras musculares en el almacenamiento post-mortem (Farouk et al., 2005; Gillet et al., 2006) y, más recientemente para la caracterización de la resistencia de lonchas de jamón curado (Romero de Ávila et al., 2014).

La información obtenida en los ensayos de tracción complementa a la aportada por el TPA. Cabe añadir que la relación esfuerzo/deformación obtenida tras la aplicación de un ensayo de tracción a un determinado material, permite analizar su comportamiento mecánico y, por tanto, obtener información sobre su deformación elástica, fluencia, deformación plástica o rotura (Romero de Ávila et al., 2014).

En cualquier caso, los ensayos de tracción y el TFA, al igual que cualquier otro análisis mecánico del comportamiento reológico, son destructivos y requieren grandes

cantidades de muestra para garantizar su repetitividad. De nuevo, en el transcurso de esta Tesis, nos planteamos la posibilidad de emplear parámetros de RMN como herramienta predictiva de las características reológicas.

En el **Trabajo 1**, el TPA se empleó para determinar el comportamiento reológico de distintos músculos (semimembranoso, semitendinoso y bíceps femoral) de jamón curado durante la maduración. Los parámetros evaluados fueron: dureza, elasticidad, cohesividad, adhesividad, gomosidad y masticabilidad. Estos atributos mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$), dependiendo del tipo de músculo y la etapa del proceso de elaboración considerados.

Conforme a estudios anteriores (Monin et al., 1997, Serra et al., 2005) la dureza aumentó durante la maduración. El descenso de la actividad de agua y el contenido en agua fue acompañado de un aumento notable de la dureza. Del mismo modo, la masticabilidad también aumentó, ya que es una característica reológica secundaria (producto de la dureza por la cohesividad por la elasticidad). La sal también puede incrementar la estabilidad y la rigidez de la estructura miofibrilar mediante su mineralización. En relación con estos hechos, en los tres músculos considerados, se observó un aumento progresivo de la dureza y la masticabilidad, alcanzando su valor máximo al final de la maduración. El músculo que mostró los valores más altos de dureza durante todo el proceso de maduración fue el semimembranoso, seguido del bíceps femoral y, finalmente, el semitendinoso, el más suave de los tres músculos estudiados. Este último mostró el contenido en grasa más alto, el nivel de mineralización más bajo debido a su posición más interna y un nivel de humedad medio. La conjunción de estos factores explicaría su menor resistencia mecánica en relación con el bíceps y, sobre todo con el semimembranoso, que por su posición más externa experimenta una rápida e intensa deshidratación

Según Serra et al., 2005, la cohesividad y la elasticidad de derivados cárnicos muestran una relación lineal positiva con la actividad de agua y el contenido de humedad. Con la deshidratación creciente durante la maduración, la cohesividad (cohesividad (grado de deformación que puede experimentar un material antes de la rotura) y la elasticidad (relación en la que un material deforme vuelve a su forma inicial tan pronto como cesa la acción de la fuerza que le deformaba) se redujeron. El músculo

semimembranoso presentó los valores más altos para cohesividad y elasticidad durante el proceso de maduración. El valor de la adhesividad también se redujo con el avance del curado. El bíceps fue el músculo que presentó el valor más bajo al final del proceso.

Este estudio conjunto de los parámetros de IRM y derivados del TPA, ha permitido obtener modelos de predicción de los atributos de textura (dureza, elasticidad, adhesividad y cohesividad) a partir de T_1 , T_2 y CDA que vendrían a indicar la existencia de una fuerte relación entre los parámetros de IRM y la estructura muscular. La dureza mostró una correlación negativa con T_1 , T_2 y CDA, mientras que la elasticidad y la cohesividad mostraron una relación positiva con dichos parámetros.

En el **Trabajo 4**, se empleó de nuevo el TPA para estudiar el comportamiento reológico de embutidos crudos curados durante la maduración y, en base a ello, se realizó un análisis multivariante de clusters que permitió la clasificación de las muestras cárnicas en distintos grupos en función del tipo de producto y del tiempo de maduración. Se calcularon, además, los coeficientes de correlación de Pearson para establecer el grado de dependencia entre los parámetros de TPA y las constantes de RMN, T_{2b} , T_{21} y T_{22} . y al igual que en el caso del jamón curado fue posible establecer relaciones entre los resultados de ambos estudios. Cabe destacar la relación negativa de T_{21} , T_{22} y T_{2b} con la dureza. La gomosidad y la masticabilidad, como característica reológicas secundarias, dependientes de la dureza, mostraron un grado de dependencia de las poblaciones T_2 similar a ésta. La elasticidad, la cohesividad y la adhesividad se relacionaron fuertemente con T_{21} . Los dos últimos parámetros de textura también se relacionaron con T_{22} . Estos resultados sugieren que los cambios de los parámetros de textura están fuertemente vinculados o condicionados por las modificaciones estructurales asociados a la evolución del componente T_{21} .

Además del análisis de TPA, en el caso del jamón, el análisis del comportamiento reológico de distintos músculos durante el proceso de curado se ha completado con la estimación de su resistencia a la rotura y del límite elástico mediante análisis de tracción destructivos (**Trabajo 2**). En términos generales, se puede decir que ambos parámetros se vieron incrementados durante la maduración, siendo especialmente notable su progresión en el músculo externo semimembranoso.

Como se ha mencionado previamente, los cambios microestructurales en jamón curado están ligados íntimamente al salado y a la deshidratación. En este sentido, la principal población detectada por relaxometría de RMN, T_{21} , ha demostrado estar positivamente relacionada con el contenido en agua, como se pone de manifiesto en los **Trabajos 2 y 4**. Por tanto, existen fuertes evidencias para pensar que es posible seguir el curso de la maduración de jamón a través del análisis de este parámetro. Los datos analizados en el **Trabajo 2**, ponen de manifiesto una relación inversa entre la fuerza de rotura y la población T_{21} , de forma similar a lo ocurrido con la dureza, otro atributo que indica la resistencia de la matriz analizada. La fuerza de rotura alcanzó su valor máximo en los músculos estudiados cuando los valores de T_{21} fueron mínimos, lo que sugiere un comportamiento antagonista entre ambas variables. Los tiempos de relajación cortos se asocian con la compactación de la matriz, por tanto, una mayor integridad y menor plasticidad del tejido, lo que requiere la aplicación de mayores fuerzas externas para alcanzar el punto de rotura.

En conjunto, los resultados obtenidos en la primera parte de la presente Tesis Doctoral indican el potencial de las técnicas de RMN, y más en concreto de la determinación de los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y transversal (valor medio de T_2 y de sus componentes T_{2b} , T_{21} , $T_{2'}$ y T_{22}) para monitorizar el proceso de maduración, los cambios estructurales y las dinámicas de distribución y movilidad de agua y grasa en distintos derivados cárnicos. Cabe de nuevo resaltar que los valores medios de los parámetros de IRM (T_1 , T_2 y CDA), así como el valor de la población T_{21} , como exponentes de la estructura del miosistema, permitirían establecer modelos matemáticos para estimar parámetros fisicoquímicos y el comportamiento reológico de productos cárnicos, destacando que, el trabajo realizado ha sido, hasta donde los autores conocen, el primer intento de estimación del comportamiento reológico de derivados cárnicos desde atributos estructurales.

Sería necesario incrementar el número de unidades analizadas para obtener modelos más robustos, así como realizar los requeridos ajustes para una mayor aproximación de los datos experimentales y calculados. No obstante, se estima que los resultados obtenidos abren una importante vía de aplicación de la relaxometría de RMN para el control, estimación de la calidad y trazabilidad de la producción de derivados cárnicos

de elevada calidad y valor añadido. Una de las ventajas más interesantes de los equipos de IRM es que son lo suficientemente grandes como para permitir el estudio de piezas cárnicas enteras, por ejemplo, jamones curados sin deshuesar. Esto permitiría el trabajo en continuo, siendo posible el acoplamiento de cintas transportadoras a los equipos para un análisis detallado de las piezas, lo cual resultaría muy atractivo desde el punto de vista productivo. Por otro lado, el empleo de relaxómetros, equipos específicos para los estudios de relaxometría, permitiría disponer de herramientas de gran utilidad para el análisis estructural con un ahorro de costes y espacio asociado, simplificando los requerimientos técnicos.

V.2. ANÁLISIS METABOLÓMICO DE DERIVADOS CÁRNICOS Y EXUDADOS

V.2.1. DERIVADOS CÁRNICOS

Los derivados cárnicos son sistemas heterogéneos y complejos desde el punto de vista estructural y bioquímico. En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado el perfil metabólico de jamón curado (**Trabajo 5**) y embutidos crudos curados, tipo salchichón (**Trabajo 6**). Los distintos compuestos presentes en estos productos, así como su evolución durante el proceso tradicional de maduración condicionan su calidad sensorial y particularidades. Para este fin se ha recurrido al potencial de la espectroscopía de ^1H RMN HRMAS, que permite el estudio de muestras semisólidas integra.

En el **Trabajo 5** se empleó la metodología ^1H RMN HRMAS para estudiar los cambios en el perfil metabólico de la carne de cerdo blanco sometida a un proceso tradicional de curado. Con este objetivo, se analizaron muestras en distintas etapas del proceso de elaboración de jamón curado: pernil fresco, salado, postsalado, en la fase de secado y en la fase de bodega. El análisis de componentes principales permitió establecer la discriminación entre muestras y su agrupación en función de su etapa de maduración. Como se mencionó anteriormente, a través del espectro de ^1H RMN HRMAS se obtiene información metabólica de la muestra mediante la monitorización de las señales de resonancia de los metabolitos de bajo peso molecular. Así, es posible identificar ácidos grasos, triglicéridos, fosfolípidos, hidratos de carbono, nucleótidos y derivados, osmolitos, aminoácidos, dipéptidos y ácidos orgánicos, entre otros. El avance de la maduración en jamón curado se tradujo en un incremento en las señales de ácidos grasos, favorecida por la concentración de macromoléculas debido a la deshidratación, y a la actividad enzimática (lipólisis), la degradación de nucleótidos, la reducción de las señales correspondientes a carbohidratos, debido al consumo de azúcares, y el aumento en las señales correspondientes a aminoácidos, debido a los fenómenos proteolíticos implicados en el desarrollo del flavor (Toldrá, 2005), especialmente notable en la región de los aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano.

Este estudio constituye una aportación novedosa al ámbito cárnico, puesto que es el primer trabajo, hasta donde los autores han podido averiguar, en el que se monitoriza

la evolución del perfil metabólico del jamón curado durante su elaboración a partir de muestras íntegras de tejido.

Un estudio similar se ha realizado en otros productos con largos periodo de maduración, como es el queso de oveja de coagulación enzimática y pasta prensada (Cruz-Díaz, 2016). En este caso fue posible discriminar las muestras en función del tratamiento térmico recibido por la leche de origen (fresca o pasteurizada), origen (Castilla la Mancha y Castilla León) y proceso de elaboración (industrial y tradicional).

Además, la espectroscopia de RMN ha permitido observar modificaciones metabólicas durante procesos distintos al curado/maduración, por ejemplo, durante el almacenamiento de ciertos miosistemas, como el salmón ahumado (Castejón et al., 2010) o la carne de ternera (Castejón et al., 2015), en los que los fenómenos de glucólisis, lipólisis, proteólisis o degradación de nucleótidos son transformaciones comunes.

Volviendo a los derivados cárnicos, la evolución metabólica observada en el jamón curado fue similar a la obtenida tras el análisis de muestras de embutidos crudos curados. En el **Trabajo 6** se aplicó la metodología ^1H RMN HRMAS en combinación con el análisis de componentes principales (PCA) para caracterizar metabólicamente el salchichón, a partir de muestras intactas de producto, sin ningún tipo de manipulación previa. Al igual que en el estudio de jamón curado, se realizaron análisis de ^1H RMN HRMAS en distintos puntos del proceso de maduración: días 0, 2, 4, 7, 11 y 14. A partir de los resultados obtenidos fue posible diferenciar entre las tres etapas principales que caracterizan la producción de este tipo de embutidos. Se obtuvieron distintos y específicos perfiles metabólicos para la etapa de formulación, fermentación y maduración. La aplicación de PCA a la totalidad de los datos espectrales adquiridos permitió la monitorización del proceso de fermentación, a través del componente principal PC1, y la clasificación de las muestras en función de su tiempo de maduración (PC2). El perfil metabólico de la etapa de formulación fue similar al obtenido para la carne fresca, con la excepción de la región de los carbohidratos en la que se observaron notables diferencias entre producto crudo y madurado, dado que la lactosa (disacárido formado por glucosa y galactosa), la dextrina (polímeros de D-glucosa) y la dextrosa (isómero D de glucosa) son ingredientes no cárnicos que fueron añadidos

intencionadamente a la masa cárnica durante el proceso de elaboración de salchichón con el fin de impulsar el crecimiento de los microorganismos presentes naturalmente en la carne. Por ello, en las muestras de salchichón, las señales de los azúcares (principalmente, glucosa y galactosa) fueron más intensas que en el producto fresco y aparecieron, además, nuevas y características señales correspondientes a los protones anoméricos de la dextrina.

En este punto, cabe destacar que durante el desarrollo de esta Tesis también se ha realizado el estudio bioquímico sobre muestras de chorizo. Los datos obtenidos a partir de estos experimentos mostraron, como era de esperar, que el perfil metabólico del producto, así como su evolución durante la maduración era bastante similares a los obtenidos con el salchichón. En la Figura V.5 se muestra la ampliación de las zonas del espectro en las que se observó mayor evolución de señales para este producto. Estos resultados forman parte de una comunicación ***“Caracterización metabólica de chorizo artesanal mediante espectroscopía de RMN”***, presentada en las ***Jornadas UCM de Investigación en Ciencias de la Salud para Pregraduados*** (Madrid, 2016).

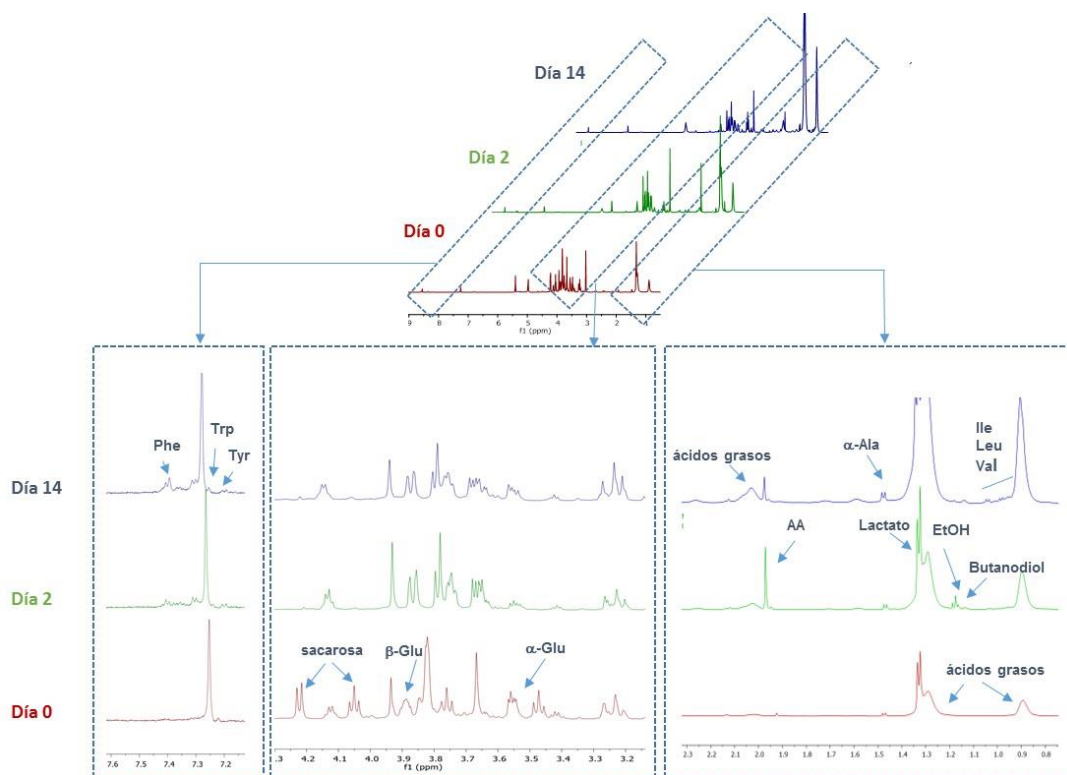


Figura V.5. Principales cambios observados en los espectros de chorizo durante los días 0, 2 y 14 de maduración. Val: valina; Ile: isoleucina; Ala: alanina; AA: ácido acético; EtOH: etanol; Glu: glucosa; Phe: fenilalanina; Trp: triptófano; Tyr: tirosina.

Las principales diferencias detectadas entre los espectros de salchichón y chorizo se observaron en el día 0 de producción, es decir, en la etapa de formulación, y, más concretamente, en la región espectral correspondiente a los carbohidratos. Este hecho se debe a que, en ambos casos, los ingredientes no cárnicos añadidos a la masa para la consecución de las características finales fueron distintos. De hecho, los espectros de chorizo están marcados por la presencia de unas señales muy intensas, ausentes en salchichón, y que se han atribuido a la presencia de sacarosa (Figura V.6), azúcar añadido intencionadamente en este tipo de derivado cárnico como fuente de energía para los microorganismos.

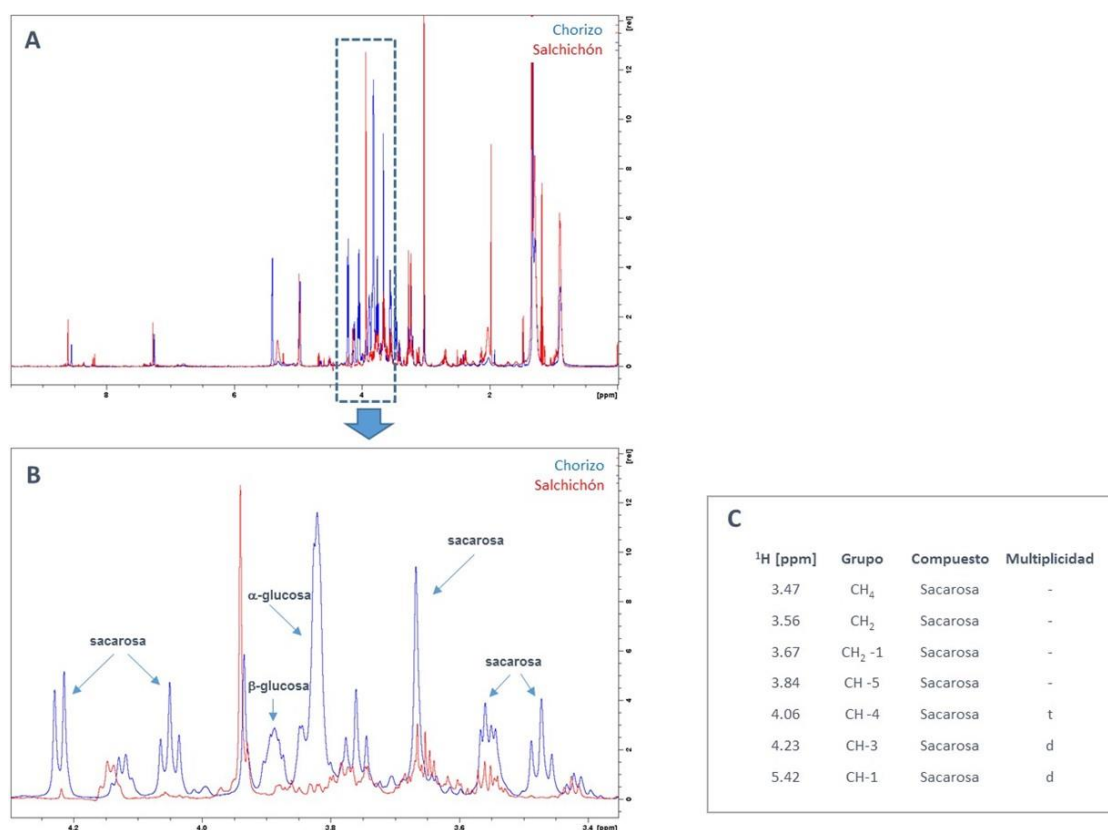


Figura V.6. Comparación de espectros salchichón vs chorizo en día 0 de producción. **A:** espectros completos. **B:** ampliación de la región de carbohidratos. **C:** asignación de las señales características de la sacarosa.

Respecto a la fermentación en las muestras de salchichón, esta etapa estuvo marcada por la reducción significativa de la intensidad de las señales correspondientes a los azúcares (α y β -glucosa, galactosa y dextrina) debido a su rápido consumo por parte de los microorganismos de la carne, principalmente bacterias ácido-lácticas (BAL). Al mismo tiempo, se produjo un incremento de las señales relacionadas con aquellos compuestos

que son, predominantemente, de síntesis microbiana. En consecuencia, se observó un incremento significativo en las señales de etanol, ácido acético, ácido láctico y 2-3-butanodiol durante las primeras 48 horas del proceso debido, principalmente, a la acción de BAL homo y heterofermentativas. En la Figura V.7 se muestran las principales vías de fermentación de los azúcares, los microorganismos implicados en cada caso y los productos finales de la fermentación.

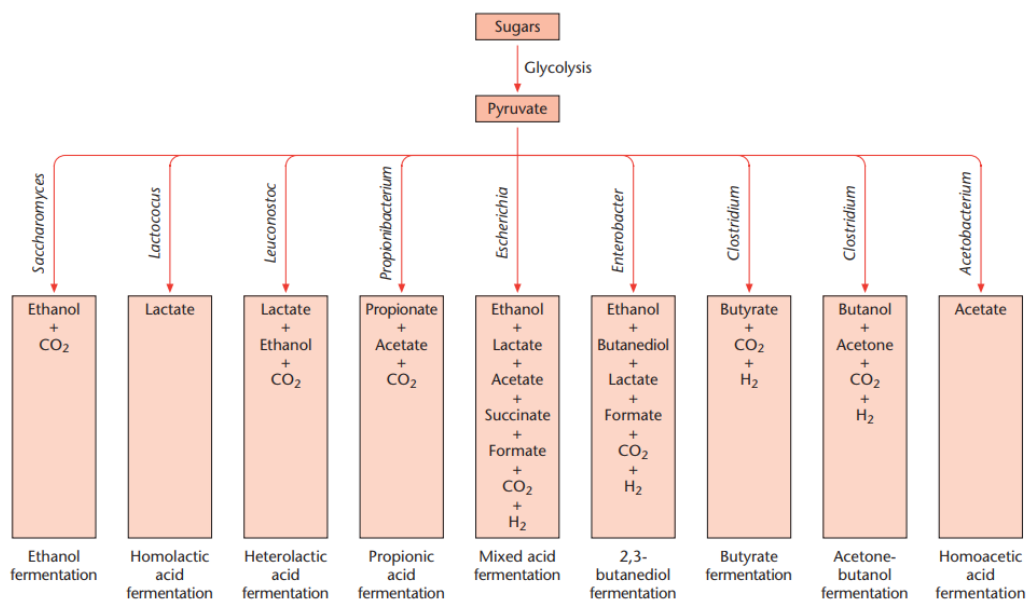


Figura V.7. Principales vías de fermentación de azúcares, microorganismos implicados y productos finales (Müller, 2008).

Durante estos primeros días del proceso y, también relacionado con la actividad microbiana, comenzó a desencadenarse una proteólisis temprana que se tradujo en el aumento de las señales correspondientes a aminoácidos: Ile, Leu, Val, α -Ala Lys, Arg, Met y Glu aumentaron durante la etapa fermentativa, así como las señales aromáticas de Phe, Tyr, Trp y Tyrm.

Además, se produjeron cambios en los nucleótidos, de manera que ATP/ADP/AMP, IMP e Ino experimentaron un descenso significativo, mientras que Hx se incrementó notablemente en esta etapa. Estos cambios concuerdan con el proceso de degradación de ATP en el músculo, de acuerdo al cual: ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow IMP \rightarrow Ino \rightarrow Hx \rightarrow Xa \rightarrow ácido úrico.

Finalmente, durante la etapa de maduración, las señales asociadas al metabolismo microbiano se redujeron significativamente o incluso desaparecieron. Por otra parte, los signos de la proteólisis y de la lipólisis se hicieron cada vez más evidentes, puesto que el incremento de las señales de aminoácidos fue notable y las intensidades relativas de las señales de ácidos grasos libres también sufrió un incremento hacia el final del proceso de elaboración. Del mismo modo, la degradación de ATP fue notable también durante esta etapa.

Al igual que en el caso del jamón curado, el estudio en embutidos resulta muy novedoso, puesto que, hasta donde los autores han podido averiguar, es la primera vez que se aplica la espectroscopía ^1H HRMAS al análisis de muestras íntegras de embutidos crudos curados con el fin de obtener el perfil metabólico completo. El trabajo revela que la RMN es una herramienta con gran potencial para el análisis de muestras intactas, con el fin de obtener información cualitativa (identificación de metabolitos) y cuantitativa (integración de señales y variación) del producto.

La metodología ^1H HRMAS es una técnica rápida y efectiva para monitorizar los cambios asociados a la maduración de derivados cárnicos y puede resultar muy útil para evaluar las variaciones del metaboloma en función de las diferentes condiciones de procesado.

V.2.2. EXUDADOS CÁRNICOS

Como se ha comentado previamente, los miosistemas son productos alimenticios de origen animal constituidos íntegramente por la parte muscular del animal del que proceden (carne o pescado) y cuyas características finales, tanto sensoriales como tecnológicas, están condicionadas por la fracción proteica miofibrilar mayoritaria.

El agua es el principal componente de la carne y el pescado y puede liberarse como una manifestación de la mayor o menor capacidad de retención que de este componente tenga la estructura cárnica. El agua liberada, junto con las sustancias solubilizadas, constituye el exudado que se aprecia sobre las superficies de corte de las porciones musculares y en su entorno. La cantidad de exudado liberado de una pieza muscular depende de diversos factores físicos y bioquímicos.

Ante la facilidad de obtención de los exudados y la no afectación o deterioro de la pieza cárnica de procedencia que su uso, como muestra de análisis, implicaría, nos planteamos evaluar la aptitud de este material para monitorizar distintos tipos de procesos en varios miosistemas mediante la espectroscopía RMN.

En este sentido, se realizaron estudios para determinar la cercanía entre la composición de metabolitos de la carne y la del exudado liberado, y si el estudio de los exudados reflejaría, a nivel metabólico, los cambios acontecidos en las porciones cárnicas de procedencia debidos a distintos factores o tratamientos. Las primeras experiencias se realizaron con exudados procedentes de carne de ternera tratada con electrones acelerados. Este estudio preliminar se llevó a cabo con el fin de determinar si el estudio de los exudados cárnicos por RMN podía ser un método analítico no invasivo que permitiera evaluar el efecto del tratamiento de irradiación en carne de vacuno. El tratamiento con electrones acelerados se utiliza para ampliar la vida útil de los alimentos y obtener un producto final seguro sin alterar sus características sensoriales. Las normativas que regulan este tratamiento varían de unos países a otros, siendo obligatoria la indicación del tratamiento en el etiquetado. Para facilitar el control e inspección de productos en este campo, es importante disponer de métodos analíticos que permitan detectar y cuantificar el tratamiento aplicado.

El análisis por RMN del exudado liberado por la carne de vacuno irradiado permitió seguir de forma indirecta la evolución de la matriz miofibrilar frente al tratamiento con electrones acelerados. En conjunto, se observaron diferencias significativas en las señales correspondientes a carnosina, carnitina, glutamato y metionina, entre muestras irradiadas y no irradiadas (Figura V.8).

Parte de los resultados obtenidos en este estudio se presentaron en el 2^a Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria ACOFESAL (Madrid, 2013), con el título, “Viabilidad del análisis de exudados cárnicos por RMN para el estudio de carne tratada con electrones acelerados”. De este estudio se concluyó que el análisis de exudados por RMN puede utilizarse como un método no invasivo, fácil y rápido para la trazabilidad de carnes irradiadas.

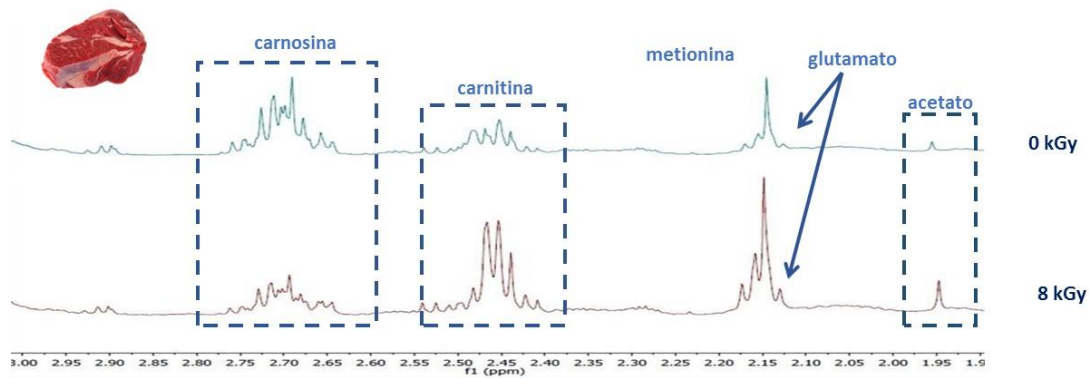


Figura V.8. Ampliación de la región del espectro de ^1H RMN de exudado de ternera que muestra la diferencia en la intensidad de señales en muestras irradiadas y no irradiadas.

Dado que las primeras experiencias demostraron claramente el potencial de los exudados cárnicos como sustrato para el análisis no destructivo mediante RMN, en la presente Tesis Doctoral se planteó continuar en esta línea de trabajo para profundizar y optimizar la aplicación de esta metodología. El estudio realizado constituye el **Trabajo 7**, en el que se ha evaluado el efecto conservador de la irradiación y la estimación del tratamiento aplicado mediante el estudio metabólico de exudados de carne de porcino. Como se ha mencionado previamente, la aplicación de electrones acelerados (radiación β) es una tecnología con un gran potencial para extender la vida útil de los alimentos. Sin embargo, este tratamiento puede modificar algunas características que pueden condicionar la aceptación por parte del consumidor y la comercialización del producto. El estudio de los cambios que se producen en los metabolitos durante la aplicación de este tipo de tratamiento resulta de gran interés, tanto para detectar productos irradiados como para determinar el límite de su uso. En este trabajo, se realizó un estudio mediante ^1H RMN HRMAS de exudados procedentes de carne de cerdo con el objetivo de monitorizar los efectos de la dosis (0, 1, 2 y 6 kGy) de irradiación y del tiempo de almacenamiento en refrigeración (0, 6 y 12 días) sobre el metaboloma cárnico. Para comprobar la reciprocidad del perfil metabólico de la carne de porcino y del exudado cárnico liberado, se realizó un análisis inicial de los espectros de la carne y de su exudado cárnico (**Trabajo 7**). El estudio comparativo de ambos espectros demostró la equivalencia entre los metabolitos detectables en ambas muestras. Las diferencias apreciadas entre los espectros cárnicos y de exudado se redujeron a las regiones correspondientes a componentes lipídicos. En ambos casos, espectros de ^1H RMN

permitieron la identificación de los principales componentes del exudado de cerdo: carbohidratos, nucleótidos, aminoácidos, dipéptidos, ácidos grasos y ácidos orgánicos. El análisis quimiométrico de los datos adquiridos mediante PCA permitió clasificar las muestras de exudados en función de la dosis de irradiación aplicada y el tiempo de almacenamiento. A través del análisis de los espectros fue posible monitorizar los efectos de la irradiación, siendo evidentes numerosos cambios metabólicos con el tiempo de almacenamiento. Se observó, por ejemplo, la degradación de azúcares, glucosa y manosa, así como de derivados nucleotídicos, Inosina e IMP, aminoácidos y dipéptidos, como el ácido glutámico y el GABA, o diversos ácidos orgánicos, como el ácido acético. La intensidad de los cambios observados fue tanto menor cuanto mayor fue la dosis de irradiación aplicada, de acuerdo con el efecto conservador del tratamiento. Además, fue posible correlaciones entre el valor de la integral de los metabolitos con el tiempo de almacenamiento y la dosis de irradiación ($R^2 = 0,96$) y obtener modelos predictivos.

En conjunto, el análisis del perfil metabólico de exudados de cerdo aportó valiosa información sobre la reducción del deterioro de la muestra por efecto de la irradiación, siendo posible la monitorización y evaluación tanto de la conservación como de la dosis de irradiación aplicada. De forma indirecta, a mayor dosis de irradiación, mayor ralentización de las reacciones/procesos de degradación.

Este estudio podría constituir el primer paso para el desarrollo de un nuevo método de análisis para el control de la conservación de la carne y para la evaluación del tratamiento de irradiación. La combinación de la metodología ^1H RMN HRMAS junto con el empleo de exudados cárnicos, permite el establecimiento de un protocolo de análisis completamente no invasivo, no destructivo, con grandes ventajas para la industria cárnica, desde el punto de vista de la rapidez analítica y la preservación del producto.

Cabe destacar que los resultados obtenidos en relación con los exudados procedentes de miosistemas no se limitan solamente a muestras cárnicas, sino que también se han realizado pruebas con resultados muy satisfactorios en matrices miofibrilares de pescado.

En este contexto, se obtuvo la información metabólica extraída mediante el análisis por espectroscopía de ^1H RMN HRMAS del exudado de merluza (*Merluccius merluccius*) y se correlacionó con el tiempo de almacenamiento y el grado de frescura del pescado. El procedimiento de estudio seguido consistió en la recolección de exudados liberados por filetes de merluza comercializados en distintos establecimientos. La toma de muestras se efectuó a distintos tiempos de su almacenamiento en refrigeración (hasta 12 días). Parte de los resultados obtenidos se recogen en el trabajo ***“Análisis metabólico del exudado de merluza (Merluccius merluccius): potencial como indicador de la conservación del pescado”***, presentado al **VIII Congreso CYTA-CESIA** (Badajoz, 2015). En la Figura V.9 se muestran ampliaciones de distintas regiones del espectro de ^1H RMN donde se observa la variación de diferentes metabolitos con el almacenamiento desde el día 1 hasta el día 12 (A). El estudio quimiométrico mediante PCA de los espectros ^1H de los exudados de merluza, permitió clasificar las muestras de acuerdo al tiempo de almacenamiento en refrigeración (4 °C), donde cada uno de los puntos representa un espectro de ^1H RMN a distintos días de almacenamiento (Figura V.9. B).

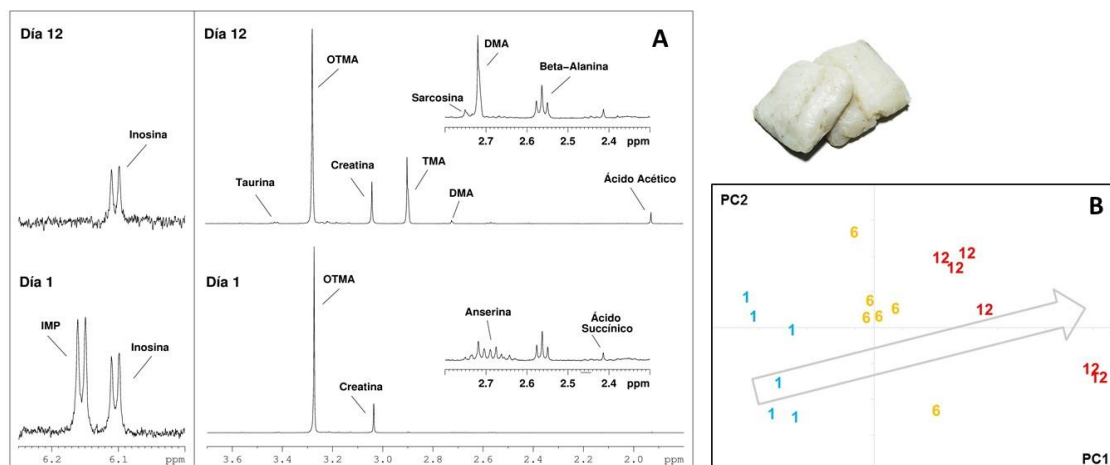


Figura V.9. Regiones del espectro de ^1H RMN que muestra la variación de metabolitos en los días 1 y 12 de almacenamiento(A) y PCA (B). OTMA: óxido de trimetilamina, DMA: dimetilamina, IMP: Inosina monofosfato

El estudio cuantitativo de los datos espectrales permitió conocer la variación de la concentración de distintos metabolitos relevantes, considerados, indicadores de la frescura del pescado. En esta línea, se detectó una reducción de IMP e inosina a medida que avanzó el tiempo de almacenamiento, ya que, como es sabido, uno de los primeros

cambios que se producen tras la muerte del animal es la degradación del ATP para formar adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), inosina monofosfato (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx). La relación de estos metabolitos constituye el valor o índice K, utilizado como indicador de frescura del pescado en diversos países. La espectroscopía de ^1H RMN HRMAS permitió seguir la evolución de IMP a Ino y de Ino a Hx. Además, este espectro también permitió identificar las señales del óxido de trimetilamina (OTMA) y trimetilamina (TMA), cuya relación también puede utilizarse como indicador de frescura. Los datos obtenidos mostraron claramente una reducción de OTMA y un incremento de TMA con el tiempo de almacenamiento. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en estudios preliminares realizados en muestras de salmón (Castejón et al., 2010; Castejón et al., 2016).

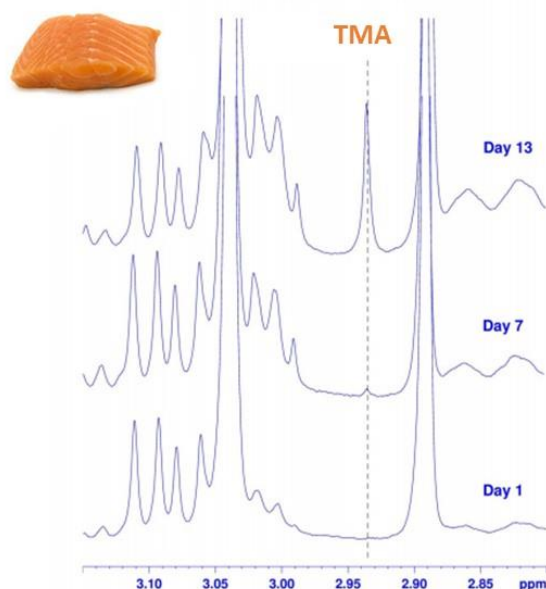


Figura V.10. Ampliación de región del espectro de ^1H RMN de exudados de salmón que muestra el aumento de TMA con el tiempo de almacenamiento. TMA: trimetilamina.

Un estudio similar se ha realizado con el exudado liberado por porciones de salmón (*Salmo salar*) para evaluar cambios durante el almacenamiento. Los resultados obtenidos constituyen el estudio titulado ***“A preliminary study of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exudates by NMR spectroscopy to evaluate fresh fish quality”*** presentado en el ***Kiel Food Science Symposium*** (Kiel, 2014). Como ocurrió con los exudados de merluza, los espectros de ^1H RMN de exudados de salmón permitieron observar el

incremento y el descenso de Ino, asociado a la degradación de nucleótidos. Así mismo también se detectó la degradación de azúcares y el incremento de TMA (Figura V.10). Se analizaron tanto las muestras de exudado con las de músculo fresco, concluyendo que se pueden monitorizar los mismos procesos de degradación en ambas matrices y que dichos procesos correlacionan con los previamente descritos por nuestro grupo sobre muestras de salmón ahumado. (Castejón *et al.*, 2016).

De los estudios preliminares realizados en exudado de pescado se concluye que este sustrato puede utilizarse como matriz analítica alternativa para estudiar la composición de pescado. Los resultados mostrados en la presente Tesis Doctoral (**Trabajo 7**) permiten realizar la misma conclusión respecto a los exudados de matrices cárnicas. En conjunto, los trabajos realizados hasta la actualidad indican que el estudio mediante espectroscopia de RMN de los exudados liberados es una metodología eficaz para determinar la calidad y el grado de frescura de miosistemas.

En conjunto, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se ha recurrido al empleo de distintas metodologías de RMN para el estudio de varias matrices de origen cárnico con un doble afán: por un lado, afianzar los conocimientos sobre procesos de producción, conservación y almacenamiento de productos cárnicos y por otro, profundizar en la adaptación de las distintas técnicas de RMN y consolidar su potencial como herramienta rápida y eficaz para el análisis no invasivo de alimentos.

VI. Conclusiones / Conclusion

Los principales resultados del trabajo presentado en esta Tesis Doctoral se pueden resumir en las siguientes **conclusiones**:

1. La relaxometría T_2 permite la monitorización del proceso de elaboración de jamón curado y embutidos crudos curados mediante la señal asociada a los protones del entorno de las miofibrillas (T_{21}).
2. Las distribuciones de los tiempos de relajación T_2 son características de cada proceso de elaboración, y pueden utilizarse como marcadores de maduración en el jamón curado (T_2) y de gelificación en los embutidos crudos curados (T_{22}), así como del efecto de la adición de proteasas en modelos cárnicos.
3. Las curvas de distribución T_2 obtenidas para distintos miosistemas pueden relacionarse con el contenido acuoso y de sal, así como con la actividad de agua y parámetros de textura.
4. Los tiempos de relajación (T_1 y T_2) y el coeficiente de difusión aparente (CDA) obtenidos mediante la Imagen de Resonancia Magnética (IRM) permiten obtener modelos de predicción para la estimación de parámetros de textura y características fisicoquímicas de jamón curado.
5. La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protón (^1H RMN), junto con la sonda de alta resolución de ángulo mágico (HRMAS, *High Resolution Magic Angle Spinning*) permite el análisis de muestras íntegras de jamón curado y embutidos crudos curados, haciendo posible la monitorización de los procesos de glucólisis, proteólisis y lipólisis que caracterizan su maduración.
6. La RMN metabolómica permite monitorizar los cambios producidos durante la maduración de miosistemas y puede utilizarse para su clasificación y para estimar el tiempo de curado.
7. Los espectros de RMN de protón (^1H RMN) de los exudados liberados por la carne de cerdo son un fiel reflejo de los obtenidos de los músculos de los que provienen y permiten monitorizar los mismos procesos descritos en las muestras sólidas. Por tanto, se propone este material para el análisis quimiométrico no invasivo,

con un elevado potencial para el estudio y control de la calidad de la carne de porcino.

8. Los exudados procedentes de carne de cerdo se proponen como material para el análisis quimiométrico no invasivo, con un elevado potencial para el estudio y control de la calidad de la carne de porcino.
9. La RMN metabólica de los exudados liberados por la carne permite estimar el tiempo de almacenamiento y evaluar el efecto conservador del tratamiento con radiaciones ionizantes.

Conclusión final

Las distintas técnicas de Resonancia Magnética Nuclear tienen un elevado potencial para el análisis de la estructura y composición de miosistemas. Los datos obtenidos pueden utilizarse en la industria cárnica para la monitorización del proceso de elaboración, estimación del tiempo de almacenamiento y predicción de características fisicoquímicas y de textura.

The principal results of the work presented in this Doctoral Thesis can be summarized in the following **conclusions**:

1. T_2 NMR relaxometry allows to monitor the manufacturing process of dry cured ham and raw cured sausages by means of the signal associated to the protons of the myofibrillar environment (T_{21}).
2. T_2 distributed data are typical of each production process and T_2 populations can be used as indicators of the ripening stage in dry cured ham ($T_{2'}$) and of protein gel formation in the raw cured sausages (T_{22}), as well as of the effect of the addition of proteases in meat models.
3. T_2 distributions obtained for different myosystems can be related to the water and salt content, as well as to the water activity and textural parameters.
4. The relaxation times (T_1 and T_2) and the apparent diffusion coefficient (ADC) calculated by Magnetic Resonance Imaging (MRI) allow to obtain predictive models for the estimation of textural parameters and physicochemical characteristics of dry cured ham.
5. Proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy, together with the high resolution magic angle spinning (HRMAS) probe allows the analysis of intact samples of dry cured ham and raw cured sausages, making possible the monitoring of the glycolysis, proteolysis and lipolysis processes typical of ripening.
6. NMR metabolomics allows to monitor the changes happened during the maturing process of myosystems and it can be used for samples discrimination and for estimating the ripening time.
7. Proton NMR spectra (^1H RMN) of exudates released from pork are a faithful reflection of the obtained for the muscle which they come from and allow to monitor the same processes described in the solid samples. Therefore, pork exudates are proposed as suitable matrix for the non-invasive chemometric analysis, with a high potential for the study and control of pork quality.

8. NMR metabolomics of pork exudates allows to estimate the storage time and to evaluate the conservative effect of the E-beam treatment.

Final conclusion

The different NMR-based techniques have a high potential for the analysis of the structure and composition of myosystems. The obtained information can be in used in the meat industry for the monitoring of the manufacturing process, estimation of the storage time and prediction of physicochemical and textural features.

VII. Bibliografía

- Aberle, E. D.; Forrest, J. C.; Gerrard, D. E.; Mills, E.W. (2012). Principles of Meat Science. 5th ed. Kendall Hunt Publishing Company, Dubuque, IA.
- Albarracín, W.; Sánchez, I. C.; Grau, R.; Barat, J. M. (2011). Salt in food processing; usage and reduction: a review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, *46*, 1329-1336.
- Andersen, R.H.; Andersen, H.J.; Bertram, H.C. (2007). Curing-induced water mobility and distribution within intra- and extra-miofibrillar spaces of three pork qualities. *Int. J. Food Sci. Technol.*, *42*, 1059-1066.
- Andrés, A. I.; Cava, R.; Martín, D.; Ventanas, J.; Ruíz, J. (2005). Lipolysis in dry-cured ham: Influence of salt content and processing conditions. *Food Chem.*, *90*, 523-533.
- ANICE (Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España). (2015).
- Antequera, M. T. & Martín, L. (2001). Reacciones químicas y bioquímicas que se desarrollan durante la maduración del jamón Ibérico. En: Tecnología del jamón Ibérico, J. Ventanas (Ed), pp. 293-323. Madrid: Mundi Prensa.
- Antequera, T.; Caro, A.; Rodríguez, P. G.; Pérez, T. (2007). Monitoring the ripening process of Iberian ham by computer vision on magnetic resonance imaging. *Meat Sci.*, *76*, 561-567.
- Arnau, J.; Guerrero, L.; Casademont, G.; Gou, P. (1995). Physical and chemical changes in different zones of normal and PSE dry-cured hams during processing. *Food Chem.*, *52*, 63-69.
- Aue, W.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. (1976). Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.*, *64*, 2229-2246.
- Batlle, N.; Aristoy, M. C.; Toldrá, F. (2000). Early postmortem detection of exudative pork meat based on nucleotide content. *J. Food Sci.*, *65*, 413-416.
- Bello, J. (2008). Jamón curado. Aspectos científicos y tecnológicos. Ed. Díaz de Santos, Madrid. ISBN: 9788479788841.
- Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959). Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Can J Biochem Phys*, *37*, 911-917.
- B.O.E. (2002). Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. Boletín Oficial del Estado, *44*, 20/2/2002, 6756-6799.
- B.O.E. (2008). Real Decreto 2129/2008, de 26 de diciembre, por el que se establece el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas. *Boletín Oficial del Estado*, *23*, 27/01/2009, 9211-9242.
- B.O.E. (2014). Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos. *Boletín Oficial del Estado*, *147*, 18/06/2014, 46058-46078.
- Bloch, F. (1946). Nuclear induction. *Phys. Rev.*, *70*, 460-464.
- Belitz, H. D.; Grosch, W.; Schieberle, P. (2012). Química de los alimentos. 3ª ed. Ed. Acribia, Zaragoza. ISBN: 978-84-200-1162-2.
- Berendsen, H. J. C. (1992). Rationale for using NMR to study water relations in foods and biological tissues. *Trends Food Sci. Technol.*, *3*, 202-205.

- Bertram, H. C.; Andersen, H. J. & Karlsson, A. H. (2001a). Comparative study of low-field NMR relaxation measurements and two traditional methods in the determination of water holding capacity of pork. *Meat Sci*, 57, 125-132.
- Bertram, H. C.; Karlsson, A. H.; Rasmussen, M.; Pedersen, O. D.; Dønstrup, S.; Andersen, H. J. (2001b). Origin of multiexponential T_2 relaxation in muscle myowater. *J Agric Food Chem*, 49, 3092-100.
- Bertram, H. C.; Dønstrup, S.; Karlsson, A. H., Andersen, H. J. (2002). Continuous distribution analysis of T_2 relaxation in meat: An approach in the determination of water-holding capacity. *Meat Sci.*, 60, 279-285.
- Bertram, H. C. & Andersen, H. J. (2004). Applications of NMR in meat science. *Annu. Rep. NMR Spectro.*, 53, 158-202.
- Bertram, H. C.; Kristensen, M.; Andersen, H. J. (2004). Functionality of myofibrillar proteins as affected by pH, ionic strength and heat treatment: A low-field NMR study. *Meat Sci.*, 68, 249-256.
- Bertram, H.C. & Andersen, H. J. (2006). Proton NMR Relaxometry in Meat Science. *Modern Magnetic Resonance*, Springer, Netherlands, 1729-1733.
- Bertram, H. C.; Andersen, H. J. (2007). NMR and the water-holding issue of pork. *J. Anim. Breed. Genet.*, 124, 35-42.
- Bertram, H. C.; Meyer, R. L.; Zhiyun, W.; Zhou, X.; Andersen, H. J. (2008). Water distribution and microstructure in enhanced pork. *J. Agri. Food Chem.*, 56, 7201-7207.
- Budiman, M.; Stroshine, R.L.; Cornillon, P. (2002). Moisture measurement in cheese analogue using stretched and multi-exponential models of the magnetic resonance T_2 relaxation curve. *Journal of Dairy Research*, 69, 619-632.
- Caplice, E. & Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 50, 131-149.
- Caro, A.; Durán, M.; Rodríguez, P. G.; Antequera, T.; Palacios, R. (2003). Mathematical morphology on MRI for the determination of Iberian ham fat content. En: Sanfeliu A., Ruiz-Shulcloper J. (eds). *Progress in Pattern Recognition, Speech and Image Analysis*. CIARP 2003. *Lecture Notes in Computer Science*, vol. 2905. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Carr, H. Y. & Purcell, E. M. (1954). Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Phys. Rev.*, 94, 630-638.
- Carrasco, J. A. (2001). Secaderos. En: Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos, Martín & Macías(Ed), pp. 995-1.020, Plasencia, Cáceres.
- Castejón, D.; Villa, P.; Calvo, M. M.; Santa-María, G.; Herraiz, M.; Herrera, A. (2010). ^1H -HRMAS NMR study of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Magn. Reson. Chem.*, 48, 693-703.
- Castejón, D.; García-Segura, J. M.; Escudero, R.; Herrera, A.; Cambero, M. I. (2015). Metabolomics of meat exudate: Its potential to evaluate beef meat conservation and aging. *Anal. Chem. Acta*, 901, 1-11.

- Castejón, D.; García-Segura, J.M.; Herrera, A.; Cambero, M.I. (2016). Effect of e-beam treatment on the methylamine compounds in Atlantic salmon. *Food Control*, 60, 455-460.
- Capitani, D.; Mannina, L.; Proietti, N.; Sobolev, A.; Tomassini, A.; Miccheli, A.; Di Cocco, M.; Capuani, G.; De Salvador, R.; Delfini, M. (2010). Monitoring of metabolic profiling and water status of Hayward kiwifruits by nuclear magnetic resonance. *Talanta*, 82, 1826-1838.
- Cernadas, E.; Carrio, P.; Rodríguez, P. G.; Muriel, E.; Antequera, T. (2005). Analyzing magnetic resonance images of Iberian pork loin to predict its sensorial characteristics. *Comput. Vis. Image Underst.*, 98, 345-361.
- Charlton, J. A. (2009). High resolution NMR analysis of complex mixtures. En: M. Gudjónsdóttir, P. S. Belton, & G. A. Webb (Eds.), *Magnetic resonance in food science: challenges in a changing world* (pp. 3-12). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Chang, S. F., Huang, T. C., Pearson, A. M. (1996). Control of the dehydration process in production of intermediate-moisture meat products: a review. En: *Advances in food and nutrition research*, Taylor, S.L. (Ed), vol. 39, pp 71-161. Academic Press, Inc., San Diego, California, EE.UU.
- Cifuentes, A. (2013). Foodomics: Advanced mass spectrometry in modern food science and nutrition, Vol. 52, John Wiley and Sons (Ed), Nueva York-USA.
- Codex Alimentario (2005). CAC/RCP 58/2005: Código de Prácticas de Higiene para la Carne. Disponible en: www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/lista-de-las-normas. Documento consultado: Marzo 2017.
- Córdoba, J. J.; Antequera, T.; García, C.; Ventanas, J.; López-Bote, C.; Asensio, M. A. (1994). Evolution of free amino acids and amines during ripening of Iberian cured ham. *J. Agri. Food Chem.*, 42, 2296-2301.
- Cruz-Díaz, K., Fernández-Valle, M.E., García-García, A.B., Castejón, D.; Escudero, R.; Romero de Ávila, M.D., Cambero, M.I. (2014). Relaxometry and MRI study of Manchego cheese during ripening and its relationship with rheological behavior. *XII International Conference on the Applications of Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance*, Cesena, Italia.
- Cruz, K.P. (2017). Aplicación de técnicas de RMN al análisis de quesos de oveja y películas comestibles. Evaluación de su potencial para la supervisión y predicción de características reológicas y estructurales. TESIS DOCTORAL
- Damez, J. L. & Clerjon, S. (2008). Meat quality assessment using biophysical methods related to meat structure. *Meat Sci*, 80, 132-149.
- DeMasi, T. W.; Wardlaw, F. B.; Dick, R. L; Acton, J. C. (1990). Non-protein nitrogen (NPN) and free aminoacids contents of dry, fermented and non-fermented sausages. *Meat Sci.*, 27, 1-12.
- Díaz, O.; Fernández, M.; García de Fernando, G. D.; De la Hoz, L.; Ordóñez, J. A. (1993). Effect of the addition of Pronase E on the proteolysis in dry fermented sausages. *Meat Sci.*, 34, 205-216.

- Díaz, O.; Fernández, M.; García de Fernando, D. G.; de la Hoz, L.; Ordóñez, J. A. (1997). Proteolysis in dry fermented sausages: the effect of selected exogenous proteases. *Meat Sci.*, 46, 115-128.
- Dolata, W.; Piotrowska, E.; Waidzik, J.; Tritt-Goc, J. (2004). The use of the MRI technique in the evaluation of water distribution in tumbled porcine muscle. *Meat Sci.*, 67, 25-31.
- Emsley, J. & Feeney, J. (2007). Forty years of progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Prog. Nucl. Magn. Reso. Spectrosc.*, 50, 179-198.
- Estévez, M.; Morcuende, D.; Ventanas, S. (2009). Determination of oxidation. En: Handbook of processed meats and poultry analysis, Press, Taylor y Francis Group (Ed), pp. 141-162. Boca Raton, Florida.
- Fantazzini, P.; Bortolotti, V.; Garavaglia, C.; Gombia, M.; Riccardi, S.; Schembri, P. (2005). Magnetic resonance imaging and relaxation analysis to predict noninvasively and non-destructively salt-to-moisture ratios in dry-cured ham. *Magn. Reson. Imaging*, 23, 359-361.
- Farouk, M.M.; Zhang, S.X. Waller, J. (2005). Meat spaghetti tensile strength and extensibility as indicators of the manufacturing quality of thawed beef. *J. Food Quality*, 28, 452-466.
- Farrán, A.; Zamora, R.; Cervera, P. (2003). Tablas de composición de alimentos del CESNID. Ed. Mc- Graw-Hill / Interamericana y Edicions Universitat de Barcelona.
- Fernández, M.; Ordóñez, J. A.; Bruna, J. M.; Herrans, B.; de la Hoz, L. (2000). Accelerated ripening of dry fermented sausages. *Food Sci. Technol.*, 11, 201-209.
- Fernández, M.; Ordóñez, J.A.; Cambero, I.; Santos, C.; Pin, C.; Hoz, L. (2007). Fatty acid composition of selected varieties of Spanish dry ham related to their nutritional implications. *Food Chem.*, 101, 107-112.
- Fiehn, O. (2001). Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp. Funct. Genomics*, 2, 155-168.
- Fiehn, O. (2002). Metabolomics the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molec. Biol.*, 48, 155-171.
- Flores, J. (1997). Mediterranean vs northern European meat products. Processing technologies and main differences. *Food Chem.*, 59, 505-510.
- Flores, M.; Aristoy, M. C.; Toldrá, F. (1996). HPLC purification and characterization of soluble alanyl aminopeptidase from porcine skeletal muscle. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2578-2583.
- Flores, M.; Aristoy, M. C.; Antequera, T.; Barat, J. M.; Toldrá, F. (2009). Effect of prefrozen ham on endogenous enzyme activity during the processing of Iberian dry-cured hams. *Meat Sci.*, 82, 241-246.
- Froehlich, D. A.; Gullett, E. A.; Osborne, W. R. (1983). Effect of nitrite and salt on the color, flavor and overall acceptability of ham. *J. Food Sci.*, 48, 152-154.

- Gálvez, M. M.; Farías A. M.; Asahi, K. T.; & Bravo C. E. (2005). Cálculo de tiempos T_1 y T_2 in vitro. *Revista chilena de radiología*, 11, 109-115
- Gandemer, G. (2002). Lipids in muscle and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Sci.*, 62, 309-321.
- García-Cañas, V.; Simó, C.; Herrero, M.; Ibáñez, E.; Cifuentes, A. (2012). Present and future challenges in food analysis: Foodomics. *Anal. Chem.*, 84, 10150-10159.
- García de Fernando, D. G.; Fox, P. F. (1991). Study of proteolysis during the ripening of a dry fermented pork sausage. *Meat Sci.*, 30, 367-383.
- García-García, A. B.; Larsen, L. B.; Cambero, M. I.; Cruz-Díaz, K.; Bertram, H. C. (2015). Proteolysis process in fermented sausage model systems as studied by NMR relaxometry. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 3039-3045.
- García- Márquez, I., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., Cabeza, M. C. (2012). Shelf life extension and sanitation of fresh pork loin by E-beam treatment. *J Food Protec.*, 75, 2179-2189.
- Godber, J. S. (1994). Nutritional Value of Muscle Foods. En: Muscle Foods. Meat Poultry and Seafood Technology. D.M. Kinsman, A.W. Kotula y B.C. Breidenstein (Eds). Chapman y Hall, New York.
- Gordon, A.; Barbut, S. (1992). Mechanisms of meat batter stabilization: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 299-332.
- Gou, P. & Comaposada, J. (2000). La transferencia de sal en el interior del jamón curado. *Eurocarne*, 86, 35-64.
- Guiheneuf, T. M.; Tessier, J. J.; Herrod, N. J.; Hall, L. D. (1996). Magnetic resonance imaging of meat products: Automated quantitation of the NMR relaxation parameters of cured pork, by both bulk NMR and MRI methods. *J. Sci. Food Agri.*, 71, 163-173.
- Hanson, S. W. F.; Olley J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochem J.*, 89, 101-102.
- Herranz, B.; de la Hoz, L.; Hierro, E.; Fernández, M.; Ordóñez, J. A. (2005). Improvement of the sensory properties of dry-fermented sausages by the addition of free aminoacids. *Food Chem.*, 91, 673-682.
- Herrero, A. M.; Cambero, M. I.; Ordonez, J. A.; Castejon, D.; Romero de Avila, M. D.; de la Hoz, L. (2007). Magnetic resonance imaging, rheological properties, and physicochemical characteristics of meat systems with fibrinogen and thrombin. *J Agri Food Chem*, 55: 9357–9364.
- Herrero, A. M.; de la Hoz, L.; Ordóñez, J. A.; Herranz, B.; Romero de Ávila, M. D.; Cambero, M. I. (2008). Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Sci.*, 80, 690-696.
- Herrero, A.M.; de la Hoz, L.; Ordóñez, J.A.; Castejón, D.; Romero de Ávila, M.D.; Cambero, M.I. (2009). Magnetic resonance imaging studies of the cold-set gelation on plasma powder and meat systems. *Food Res. Int.*, 42, 1362-1372

- Honikel, K. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Sci.*, 78, 68-76.
- Huff-Lonergan, E. & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci.*, 71, 194-204.
- Incze, K. (1992). Raw fermented and dried meat products. *Fleischwirtschaft*, 72, 58-72.
- Joo, S. T. & Kim, G. D. (2011). Meat quality traits and control technologies. S.T. Joo (Ed.), Control of meat quality, Research Signpost, 6-10, Kerala, India.
- Jurado, A.; García, C.; Timón, M.; Carrapiso, A. (2007). Effect of ripening time and rearing system on amino-acid related flavor compounds of Iberian ham. *Meat Sci.*, 75, 585-594.
- Kim, G. P.; Jung, E. Y.; Lim, H. J.; Yang, H. S.; Joo, S. T.; Jeong, J. Y. (2013). Influence of meat exudates on the quality characteristics of fresh and freeze-thawed pork. *Meat Sci.*, 95, 323-329.
- Koohmaraie, M. (1994). Muscle proteinases and meat aging. *Meat Sci.*, 36, 93-104.
- Kuo, M. I.; Gunasekaran, S.; Johnson, M.; Chen, C. (2001). Nuclear magnetic resonance study of water mobility in pasta filata and non-pastafilata Mozzarella. *J. Dairy Sci.*, 84, 1950-1958.
- Laghi, L.; Picone, G.; Capozzi, F. (2014). Nuclear magnetic resonance for foodomics beyond. Food analysis. *Trends Anal. Chem.*, 59, 93-102.
- Larrea, (2003). Caracterización química y microestructural de proceso de elaboración de jamón curado D.O. Teruel. (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de los Alimentos. Valencia, España.
- Larson, G.; Dobney, K.; Albarella, U.; Fang, M.; Matisoo-Smith, E.; Robins, J.; Lowden, S.; Finlayson, H.; Brand, T.; Willerslev, E.; Rowley-Conwy, P.; Andersson, L. y Cooper, A. (2005). Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*. 307, 1618-1621.
- Lauterbur, P. C. (1973). Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature*, 242, 190-191.
- Lavine, B. & Workman, J. J. (2004). Chemometrics. *Anal. Chem.*, 76, 3365-3372.
- Li, Y.; Jia, W.; Zhang, C. H.; Li, X.; Wang, L. C.; Zhang, D. Q.; Mu, G. F. (2014). Fluctuated low temperature combined with high-humidity thawing to reduce physicochemical quality deterioration of beef. *Food Bioprocess Tech.*, 7, 3370-3380.
- Liang, Z. & Lauterbur, P. C. (2000). *Principles of magnetic resonance imaging*. SPIE Optical Engineering, New York.
- Lücke, F. K. (1998). Fermented sausages. En: Microbiology of Fermented Foods, Wood, B. J. B. (Ed), pp. 441-483. Blackie Academic and Professional. Londres, Reino Unido.
- Luo, J.; Pan, T.; Gou, H. Y.; Ren, F. Z. (2013). Effect of calcium in brine on salt diffusion and water distribution of Mozzarella cheese during brining. *J. Dairy Sci.*, 96, 824-831.
- Mannina, L.; D'Imperio, M.; Capitani, D.; Rezzi, S.; Guillou, C.; Mavromoustakos, T.; Vilchez, M. D.; Fernández, A. H.; Thomas, F.; Aparicio, R. (2009). ¹H NMR based protocol for the

- detection of adulterations of refined olive oil with refined hazelnut oil. *J. Agri. Food Chem.*, 57, 11550-11556.
- Mansfield, P. & Grannell, P. K. (1973). NMR diffraction in solids? *Journal of Physics C: solid state physics*, 6, L422.
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente) (2016a). Indicadores económicos de la carne de cerdo 2015. Disponible en: www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccionymercadosganaderos/indicadoreseconomicoscarnedecerdo2015_tcm7-422853.pdf. Documento consultado: Marzo 2017.
- MAPAMA (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente) (2016b). Informe de consumo alimentario 2015. Disponible en: www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumoycomercializacionydistribucionalimentaria/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos. Documento consultado: Marzo 2017.
- Marusic, N.; Aristoy, M. C.; Toldrá, F. (2013). Nutritional meat compounds as affected by ham dry-curing. *Meat Sci.*, 93, 53-60.
- Martín, L.; Córdoba, J. J.; Ventanas, J.; Antequera, T. (1999). Changes in intramuscular lipids during ripening of Iberian dry-cured ham. *Meat Sci.*, 51, 129-134.
- McDonnell, C. K.; Allen, P.; Duggan, E.; Arimi, J. M.; Casey, E.; Duane, G.; Lyng, J. (2013). The effect of salt and fibre direction on water dynamics, distribution and mobility in pork muscle: A low field NMR study. *Meat Sci.*, 95, 51-58.
- Meiboom, S. & Gill, D. (1958). Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Rev. Sci. Instrum.*, 29, 688-691.
- Melody, J. L.; Lonergan, S. M.; Rowe, L. J.; Huiatt, T. W.; Mayes, M. S.; Huff-Lonergan, E. (2004). Early postmortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *J. Anim. Sci.*, 82, 1195-1205.
- Mitchell, A. D.; Scholz, A. M.; Wang, P. C.; Song, H. (2001). Body composition analysis of the pig Magnetic Resonance Imaging. *J. Anim. Sci.*, 79, 1800-1813.
- Møller, S.; Gunvig, A.; Bertram, H. C. (2010). Effect of starter culture and fermentation temperature on water mobility and distribution in fermented sausages and correlation to microbial safety studied by nuclear magnetic resonance relaxometry. *Meat Sci.*, 86, 462-467.
- Molly, K.; Demeyer, D.; Johansson, G.; Raemaekers, M.; Ghistelinck, M.; Geenen, I. (1997). The importance of meat enzymes in ripening and flavor generation in dry fermented sausages. First results of a European project. *Food Chem.*, 59, 539-545.
- Mora, L. (2010). *Determinación de compuestos bioquímicos para el control de calidad en la elaboración de jamón cocido y jamón curado*. (Tesis Doctoral). Universidad de Valencia. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA). Valencia, España.
- Moreiras, O.; Carbajal, A.; Cabrera, L.; Cuadrado, C. (2013). Tablas de composición de alimentos. 16 ed. Ed. Pirámide. ISBN: 9788436829037.

- Morrissey, P. A.; Sheehy, P. J. A.; Galvin, K.; Kerry, J. P.; Buckley, D. J. (1998). Lipid stability in meat and meat products. *Meat Sci.*, 49, 73-86.
- Muguerza, E.; Ansorena, D.; Astiasaran, I. (2003). Improvement of nutritional properties of chorizo de Pamplona by replacement of pork backfat with soy oil. *Meat Sci.*, 65, 1361-1367.
- Mulas, G.; Roggio, T.; Uzzau, S.; Anedda, R. (2013). A new magnetic resonance imaging approach for discriminating Sardinian sheep milk cheese made from heat-treated or raw milk. *J. Dairy Sci.*, 96, 7393-7403.
- Müller, V. In Bacterial Fermentation; John Wiley&Sons: Chichester. UK, 2008. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001415.pub2.
- Motilva, M. J.; Toldrá, F.; Nieto, P.; Flores, J. (1993). Muscle lipolysis phenomena in the processing of dry-cured ham. *Food Chem.*, 48, 121-125.
- Monin, G.; Marinova, P.; Talmant, A.; Martin, J. F.; Cornet, M.; Lanore, D.; Grasso, F. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Sci.*, 47, 29-47.
- Nawar, W.W. (1996). Lipids. En: Food Chemistry, O.R. Fennema (Ed), pp. 225-319. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Olmos, J. V. (2006). Atlas Monte Nevado de anatomía del jamón serrano. Edita Jamones Segovia, S.A.
- Ordóñez, J. A.; Cambero M. I.; Fernández, L.; García M. L.; García de Fernando, G.; de la Hoz, L.; Selgas, M. D. (1998). Cambios post mortem del músculo. En: Tecnología de los Alimentos. Alimentos de origen animal. 170-184. Síntesis (Ed), Madrid.
- Ordóñez J. A.; Hierro, E. M.; Bruna, J. M.; de la Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 39, 329-367.
- Ordóñez J.A. & de la Hoz, L. (2001). Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Alteraciones. En: Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos, vol. II, Martín & Macías (Ed), pp. 1063-1090, Cáceres.
- Organización Mundial de la Salud. Carcinogenicidad de la carne roja y de la carne procesada. Disponible en: <http://www.who.int/features/qa/cancer-red-meat/es/>. Consultado en: Octubre 2017.
- Pearce, K. L.; Rosenvold, K.; Andersen, K. J.; Andersen, H. J.; Hopkins, D. L. (2011). Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes: A review. *Meat Sci.*, 89, 111-124.
- Pichner, R.; Hechelmann, H.; Gareis, M.; Steinruck, H. (2006). Shigatoxin producing *Escherichia coli* (STEC) in conventionally and organically produced salami products. *Fleischwirtschaft*, 86, 112-114.
- Purcell, E. M.; Torrey, H.; Pound, R. V. (1946). Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys. Rev.*, 69, 37-38.
- Prändl, O.; Fischer, A.; Schmidhofer, T.; Sinell, H. J. (1994). Tecnología e higiene de la carne. Acibia (Ed), Zaragoza.

- Piñeiro, M. E.; Punín, M. O.; Lage, M. A. (2001). Determinación de ácidos grasos en carne de cerdo. En: *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*. ISSN: 0300-5755, Vol. 327, 41-45.
- Pospiech, E.; Grzes, B.; Lyczynski, A.; Borzuta, K.; Szalata, M.; Mikolajczak, B. (2003). Muscle proteins and their changes in the process of meat tenderization. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 21, 133-155.
- Prieto, B. & Carballo, J. (1997). El control analítico de la calidad en los productos cárnicos crudos-curados. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1, 112-120.
- Price, J. F. & Schweigert, B. S. (1994). *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Acribia (Ed), Zaragoza.
- Ramakrishnan, V. y Luthria, D. L. (2017). Recent applications of NMR in food and dietary studies. *J. Sci. Food Agri.*, 97, 33-42.
- Ramírez, C.; Germain, J. C.; Aguilera, J. M. (2009). Image analysis of representative food structures: application of the bootstrap method. *J. Food Sci.*, 74, 65-72.
- Romero de Ávila, M. D; Escudero, R.; Ordóñez, J. A.; Cambero, M. I. (2014). Weibull analysis characterizes the breaking properties of dry-cured ham slices. *Meat Sci.*, 97, 451-458.
- Ruan, R. R. y Chen, P. L. (1998). *Water in Foods and Biological Materials: A Nuclear Magnetic Resonance Approach*. 1st edition ed. Technomic Publishing Company, Inc, Lancaster, Pennsylvania.
- Sánchez-Molinero, F. & Arnau, J. (2010). Processing of dry-cured ham in a reduced-oxygen atmosphere: Effects on sensory traits. *Meat Sci.*, 85, 420-427.
- Savage, A. W.; Warriss, P. D.; Jelley, P. D. (1990). The amount and composition of the proteins in drip from stored pig meat. *Meat Sci.*, 27, 289-303.
- Scheffler, T. L. & Gerrard, D. E. (2007). Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Sci.*, 77, 7-16.
- Schievano, E.; Pasini, G.; Cozzi, G.; Mammi, S. (2008). Identification of the production chain of Asiago d'Alveo cheese by nuclear magnetic resonance spectroscopy and principal component analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 7208-7214.
- Serra, X.; Ruiz-Ramirez, J., Arnau, J.; Gou, P. (2005). Texture parameters of dry-cured ham, muscle biceps femoris samples, dried at different levels as a function of water activity and water content. *Meat Sci.*, 69, 249-54.
- Skiba, G.; Raj, S.; Polawska, E.; Pastuszewska, B.; Elminowska-Wenda, G.; Bogucka, J.; Knecht, D. (2012). Profile of fatty acids, muscle structure and shear force of musculus *longissimus dorsi* (MLD) in growing pigs as affected by energy and protein or protein restriction followed by realimentation. *Meat Sci.e*, 91, 339-346.
- Skibsted, L. H. (1992). Cured meat products and their oxidative stability. En: *The chemistry of muscle based foods*, D. A. Ledward, D. E. Johnston y M. K. Knight (Eds), pp. 266-286. Londres: Royal Society of Chemistry.
- Skibsted, L. H. (2011). Nitric oxide and quality and safety of muscle based foods. *Nitric Oxide – Biol. Chem.*, 24, 176-183.

- Suárez, M.V.; Barba, C.; Forero, J.; Sereno, J. R. B.; Diéguez, E.; Delgado, J. V. (2002). Reproductive characterization of various pig breed from Iberian origin. I. Descriptive analysis. *Archivos de Zootecnia*, 51, 245-248.
- Tautenhahn, R.; Cho, K.; Uritboonthai, W.; Zhu, Z.; Patti, G. J.; Siuzdak, G. (2012). An accelerated workflow for untargeted metabolomics using the METLIN database. *Nat. Biotechnol.*, 30, 826-828.
- Toldrá, F.; Cerveró, C.; Part, C. (1993). Porcine aminopeptidase activity as affected by curing agents. *J. Food Sci.*, 58, 724-726.
- Toldrá, F.; Flores, M.; Aristoy, M. C.; Virgili, R.; Parolari, G. (1996). Pattern of muscle proteolytic and lipolytic enzymes from light and heavy pigs. *J. Sci. Food Agri.*, 71, 124-128.
- Toldrá, F. (1998). Proteolysis and lipolysis in flavour development of drycured meat products. *Meat Sci.*, 49, 101-110.
- Toldrá, F. (2006). Dry-cured ham. En: Handbook of Food Science Technology and Engineering. CRC Press (Ed), pp 164.1-164.11, Boca Raton, E.E.U.U.
- Toldrá, F. & Aristoy, M.C. (2010). Dry-cured ham. En: Handbook of Meat Processing, F. Toldrá (Ed), pp.351-362. Ames, Iowa.
- Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins-Implications on structure and quality of meat products. *Meat Sci.*, 70, 493-508.
- Totosaus, A., Montejano, G. J., Salazar, J. A., Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein-gel induction. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 37, 589-601.
- Ventanas, J. (2001). Factores del proceso que determinan la calidad del jamón. En: Jamón Ibérico y Serrano. Fundamentos de la elaboración y de la calidad. pp. 63-103, Paraninfo (Ed), Madrid.
- Wakamatsu, J., Hayashi, N., Nishimura, T., y Hattori, A. (2010). Nitric oxide inhibits the formation of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX. *Meat Science*, 84, 125– 128.
- Windham, C. T.; Wyse, B. W.; Hansen, R.G. (1990). Thiamin, riboflavin, niacin and pantothenic acid. En: Meat and Health, Advanced Materials Research. Volume: 6. M. Pearson y T.R. Dutson (Ed), págs. 401-459. Elsevier Applied Science, London.
- Wüthrich, K. (1974). Nuclear magnetic resonance in protein research. *Experientia*, 30, 577-585.
- Xia, X.; Kong, B.; Liu, Q.; Liu, J. (2009). Physicochemical change and protein oxidation in porcine *longissimus dorsi* as influenced by different freeze–thaw cycles. *Meat Sci.*, 83, 239-245.
- Zhang, G.; Hailemariam, D.; Dervishi, E.; Deng, Q.; Goldansaz, S. A.; Dunn, S. M.; Ametaj, B. N. (2015). Alterations of innate immunity reactants in transition dairy cows before clinical signs of lameness. *Animals*, 5, 717-747.

VIII. Índice de abreviaturas

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

a_w : Actividad de agua

ATP: adenosín trifosfato

AMP: adenosín monofosfato

BAL: Bacterias ácido-lácticas

BF: bíceps femoral

BHT: Butilhidroxitolueno

CDA: Coeficiente de difusión aparente

CE-MS: Espectroscopía de masas acoplada a electroforesis capilar

CH1: Chorizo con 20% de grasa

CH2: Chorizo con 40% de grasa

CIIC: Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer

CMPG: Carl-Purcell-Meiboom-Gill

CPD: *Critical point drying*

CRA: Capacidad de retención de agua

DFD: *Dark, firm, dry*

D.O.P.: Denominación de origen protegida

DP: Densidad protónica

DSS: 3,3-dimetil-2,2-silapentano-5-sulfónico

DTT: Ditiotreitól

EDTA: etilendiaminotetraacético

ES: Extracto seco

E.T.G.: Especialidad tradicional garantizada

FID: *Free inducción decay*

FOV: *Field of View*

GC-MS: Espectroscopía de masas acoplada a cromatografía de gases

^1H -COSY: *Correlated spectroscopy*

^1H -TOCSY: *Total correlated spectroscopy*

^1H -NOESY: *Nuclear overhauser effect spectroscopy*

^1H ,X-HSQC: *Heteronuclear single quantum correlation*

$^1\text{H},\text{X}$ -HMQC: *Heteronuclear multiple quantum correlation*

$^1\text{H},\text{X}$ -HMBC: *Heteronuclear multiple bond correlation*

HR: humedad relativa

HRMAS: *High resolution magic angle spinning*

Hx: Hipoxantina

I.G.P.: Indicación geográfica protegida

IMP: Inosina monofosfato

Ino: Inosina

IRM: Imagen de resonancia magnética

LC-MS: Espectroscopía de masas acoplada a cromatografía líquida

LF-NMR: *low-field NMR*

Mb: Mioglobina

MEB: Microscopía electrónica de barrido

MS: Espectroscopía de masas

NMR: *Nuclear Magnetic Resonance*

NP: Nitrógeno peptídico

NPP: Nitrógeno no proteico

OMS: Organización Mundial de la Salud

OTMA: Óxido de trimetilamina

PC: *Principal component*

PCA: *Principal component analysis*

Phe: Fenilalanina

PLS: *Partial least squares*

PSE: *Pale, soft, exudative*

R.D.: Real Decreto

RF: Radiofrecuencia

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROI: *Region of interest*

S1: Salchichón con 20% de grasa

S2: Salchichón con 40% de grasa

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel*

SEM: *Scanning electron microscopy*

SM: Semimembranoso

SMS: Sistema modelo sin enzimas adicionadas

SMS+P: Sistema modelo con enzimas adicionadas

ST: Semitendinoso

T₁: Tiempo de relajación longitudinal

T₂: Tiempo de relajación transversal

TMA: Trimetilamina

TE: Tiempo de eco

TF: Transformada de Fourier

TMS: Tetrametilsilano

TPA: *Texture profile analysis*

TR: Tiempo de repetición

Trp: Triptófano

TSP: 3-(trimetilsilil)propionato-2,2'-3,3'-sódico-*d*₄

Tyr: Tirosina

En conjunto, se estima que se han abordado objetivos de interés científico y tecnológico, especialmente mediante la optimización de técnicas de RMN para el estudio de productos madurados y la estimación de su potencial de aplicación, como técnicas no destructivas, a nivel industrial.

